

**Funktionsanalyse der Linker-Histon Genfamilie aus
Arabidopsis thaliana mit doppelsträngiger RNA
und
Expressionsanalyse gewebespezifischer Promotoren aus der
Zuckerrübe**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Heiko Oltmanns
aus Leer (Ostfriesland)

1. Referent:

Prof. Dr. Reinhard Hehl

2. Referent:

Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel

eingereicht am:

28. Oktober 2004

mündliche Prüfung (Disputation) am:

17. Februar 2005
2005 (Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Patente

Hehl, R., Oltmanns, H., Stahl, D. (2004). Ein Wurzel- und xylemparenchymspezifischer Promotor. Deutsches Patentamt, München, eingereicht.

Tagungsbeiträge

Oltmanns, H., Kloos, D.U., Dock, C., Stahl, D., Hehl, R. (2001). Novel taproot expressed genes from Sugar Beet. Poster. 14. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“, Dabringhausen.

Oltmanns, H., Hehl, R. (2003). Functional analysis of linker-histone variants in *Arabidopsis thaliana*. Poster. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona (Spanien).

Oltmanns, H., Hehl, R. (2004). Functional analysis of linker-histone variants in *Arabidopsis thaliana* by RNAi. Poster. Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	Aminosäuren
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU-PAGE	Acid-Urea-Polyacrylamidgelelektrophorese
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
BNYVV	Beet necrotic yellow vein virus
BvHis1-r	<i>Beta vulgaris</i> His1-root protein
BvMII	<i>Beta vulgaris</i> Major-latex-like protein
BvSMP	<i>Beta vulgaris</i> Small protein
BvTlp	<i>Beta vulgaris</i> Thaumatin-like protein
C	Cytidin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre DNA
d	Tag
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
dd	doppelt destilliert
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
evtl.	eventuell
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Farad
g	gravity (Erdbeschleunigung)

g	Gramm
G	Guanosin
GapC	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
HMG	High Mobility Group
ihp	Intron containing hairpin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISAAA	International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications
kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
KD	Knock-down
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LUC	Luciferase
LWF	Lagerung-Wurzel-Forward
nt	Nukleotide
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige-Skoog
4-MUG	4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PTGS	Posttranskriptionelles Gen-Silencing
PR	Pathogenesis related
rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz

RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	„small inhibitory“ RNA
SSC	Standard Saline Citrat
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-Puffer
TBS	Tris buffered saline
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TKD	Triple-Knock-down
TLP	Thaumatococcus-like protein
tRNA	„transfer“ RNA
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Bedeutung transgener Pflanzen	1
1.2	Bedeutung von gewebespezifischen Promotoren.....	2
1.3	Die Zuckerrübe.....	5
1.4	Core- und Linker-Histone	10
1.5	Posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS)	16

2. Material und Methoden

2.1	Chemikalien und Enzyme.....	18
2.2	Kits.....	18
2.3	Plasmide	18
2.4	Bakterienstämme	19
2.5	Pflanzenlinien	20
2.6	Oligonukleotide	20
2.7	Antikörper und Peptide.....	22
2.8	Konstrukte.....	23
2.8.1	Promotor- β -Glucuronidase-Reportergenkonstrukte für die Expressions- analyse von Zuckerrübenpromotoren in Tabak.....	23
2.8.2	Promotor-Luciferase-(LUC)-Reportergenkonstrukte für stabile Expressionsanalysen in der Zuckerrübe.....	25
2.8.3	PTGS-Konstrukte für das Silencing von Linker-Histon-Varianten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
2.8.4	Promotor-GUS-Konstrukte für die Linker-Histon-Promotoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
2.8.5	Konstrukte für die Expression der Linker-Histon-Varianten von <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> in <i>E. coli</i>	30
2.9	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	31
2.10	Spezielle molekularbiologische Methoden.....	31
2.10.1	Semiquantitative RT-PCR	31
2.10.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mittels Elektroporation	32
2.10.3	Aufreinigung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> im kleinen Maßstab	33
2.10.4	Aufreinigung von RNAs mit geringem Molekulargewicht (5S RNA, tRNAs, siRNAs) aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	33

2.10.5	Northern-Blot-Analyse zum Nachweis von siRNAs.....	34
2.11	Proteinbiochemische Techniken.....	35
2.11.1	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	35
2.11.2	Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität	35
2.11.3	Nachweis der Luciferase-Aktivität.....	36
2.11.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.11.5	Acid-Urea Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.11.6	Aufreinigung von säurelöslichen Kernproteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.11.7	Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Linker-Histon-Varianten mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	40
2.11.8	Affinitätsaufreinigung von Antikörpern	41
2.11.9	Western-Blot-Analyse.....	42
2.12	Arbeiten mit Pflanzen	43
2.12.1	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
2.12.1.1	Kultivierung von <i>A. thaliana</i>	43
2.12.1.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels Floral-dip.....	43
2.12.1.3	Identifizierung von homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten mittels PCR	44
2.12.1.4	Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
2.12.2	Arbeiten mit Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	46
2.12.2.1	Kultivierung von <i>N. tabacum</i>	46
2.12.2.2	Transformation von Tabak mittels Blattscheibentransformation.....	46
2.13	Statistische und computergestützte Methoden	47

3. Ergebnisse

3.1	Expressionsanalyse von fünf potentiell wurzelspezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe im homologen und heterologen System.....	48
3.1.1	Expressionsanalyse der Promotoren im homologen System	48
3.1.1.1	Der BvTlp1 Promotor wird im Begleitgewebe des Xylems exprimiert.....	48
3.1.1.2	Der BvHis1-r Promotor wird in der Rübe stärker exprimiert als im Blatt und zeigt eine erhöhte Expression im Xylemparenchym der Rübe	51
3.1.1.3	Der BvMII Promotor wird sehr stark im gesamten Wurzelgewebe exprimiert, jedoch kaum im Blatt.....	53
3.1.1.4	Der Promotor von BvSmp vermittelt in der Zuckerrübe kein einheitliches Expressionsprofil.....	55
3.1.1.5	Das Expressionsprofil von BvTlp2 in der Zuckerrübe ist nicht einheitlich.....	58

3.1.2	Expressionsanalyse der fünf wurzelspezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe in Tabak	60
3.1.2.1	Der BvSmp Promotor ist in Tabak spezifisch in der Wurzel und im Hypokotyl aktiv	60
3.1.2.2	Der BvMll Promotor vermittelt in Tabak eine gewebespezifische Expression und ist in der Wurzel, im Hypokotyl sowie im Leitgewebe des Blattes aktiv.	63
3.1.2.3	Der BvTlp1 Promotor vermittelt in Tabak eine gewebespezifische Expression, ist aber nur schwach aktiv	65
3.1.2.4	Der BvTlp2 Promotor ist in der Epidermis der Tabakwurzel sowie in den Wurzelhaaren aktiv	67
3.1.2.5	Der BvHis1-r Promotor vermittelt Reportergenexpression in Blatt, Wurzel und Hypokotyl	69
3.2	Expressionsprofil der Linker-Histon-Varianten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
3.2.1	Die Linker-Histone von <i>Arabidopsis thaliana</i> werden nahezu ubiquitär exprimiert, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Expressionsstärke in den unterschiedlichen Geweben	71
3.3	Funktionsanalyse von Linker-Histon-Varianten in <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels PTGS (Posttranskriptionelles Gen Silencing)	76
3.3.1	<i>In planta</i> transformierte ihp-Konstrukte reduzieren den mRNA-Gehalt ihrer Zielgene His1-1, His1-2, His1-3.....	76
3.3.2	Linker-Histon Knock-down Pflanzen zeigen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp.....	79
3.3.3	Western-Blot-Analyse von Triple-Knock-down Linien	80
3.3.3.1	Funktionsanalyse der Antikörper gegen His1-1, His1-2 und His1-3 mit in <i>E. coli</i> überexprimierten rekombinanten Linker-Histonen	81
3.3.3.2	Auf Proteinebene ist kein Silencing von His1-1 in Triple-Knock-down Pflanzen nachweisbar.	82
3.3.4	Analyse von His1-1- Single-Knock-downs	84
3.3.4.1	His1-1 Single-Knock-down Linien mit zwei T-DNA-Loci weisen reduzierten His1-1 Proteingehalt auf	84
3.3.4.2	His1-1 Single-Knock-down Linien mit einem und mit zwei T-DNA-Loci weisen einen reduzierten His1-1 mRNA-Gehalt auf	85
3.3.4.3	Das ihp-Konstrukt für His1-1 bewirkt <i>in planta</i> die Bildung von siRNAs	86

4. Diskussion

4.1	Expressionsanalyse von fünf Promotoren aus der Zuckerrübe	88
-----	-----------------------------------------------------------------	----

4.1.1	Vergleich der Expressionsprofile der fünf untersuchten Promotoren in Tabak und in der Zuckerrübe	88
4.1.1.1	Der Promotor von BvTlp1 weist in Tabak und in der Zuckerrübe ein sehr ähnliches Expressionsprofil auf	89
4.1.1.1.1	Das Genprodukt von BvTlp1 spielt vermutlich bei der konstitutiven Abwehr von Pathogenen eine Rolle	90
4.1.1.2	Die Expressionsprofile des BvMII Promotors in Tabak und in der Zuckerrübe sind ähnlich	92
4.1.1.3	Die Expressionsprofile von BvHis1-r in der Zuckerrübe und in Tabak stimmen nur teilweise überein und unterscheiden sich von dem quantitativen Expressionsprofil des BvHis1-r Homologs aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	93
4.1.1.4	Der Promotor von BvTlp2 weist in Tabak und in der Zuckerrübe jeweils ein unterschiedliches Expressionsprofil auf	93
4.1.1.4.1	Ist das Genprodukt von BvTlp2 an der konstitutiven Pathogenabwehr in den Wurzelhaaren bzw. der Wurzelepidermis beteiligt?	95
4.1.1.5	Die Reportergenexpression von BvSmp ist sowohl in der Zuckerrübe als auch in Tabak mit den Transportgefäßen der Wurzel assoziiert	95
4.1.2	Biotechnologische Anwendbarkeit der untersuchten Promotoren	96
4.1.2.1	Der BvMII Promotor könnte sowohl für das Molecular Farming als auch für die Optimierung von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen eingesetzt werden.	98
4.1.2.2	Der Promotor von BvTlp1 eignet sich für die Expression von Genen in der Zuckerrübe, die einen Einfluss auf die Pathogenabwehr sowie auf Transportprozesse im Xylemparenchym haben	100
4.1.2.3	Der Promotor von BvTlp2 eignet sich in Tabak für die Expression von Pathogenabwehrgenen oder von Genen, die die Nährstoffaufnahme aus dem Boden verbessern	101
4.2	Funktionsanalyse der Linker-Histon-Varianten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	103
4.2.1	Analyse des Expressionsprofils	103
4.2.2	Vorteile der Funktionsanalyse von Linker-Histon-Varianten durch PTGS	104
4.2.3	Problematik der Funktionsanalyse von Linker-Histon-Varianten durch PTGS	105
4.2.4	Ist das Silencing von His1-1 kopienabhängig?	106
4.2.5	Wird der Silencing-Effekt für His1-1 nicht vererbt?	108

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Anhang

1. Einleitung

Für die Expression von Transgenen in Pflanzen werden Promotoren benötigt, die die Expression dieser Gene regulieren (Potenza *et al.*, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden fünf potentiell wurzelspezifische Promotoren der Zuckerrübe hinsichtlich ihrer Wurzelspezifität charakterisiert. Hintergrund der Expressionsanalyse der Promotoren ist eine mögliche biotechnologische Anwendung dieser Promotoren in transgenen Nutzpflanzen. Bei einem der untersuchten fünf Promotoren handelt es sich um den Promotor einer Linker-Histon-Variante. Für eine Funktionsanalyse von Linker-Histone Varianten wurden die drei Linker-Histone aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Der erste Teil der Arbeit beinhaltet die Expressionsanalyse der Promotoren aus der Zuckerrübe, der zweite die Funktionsanalyse der Linker-Histone aus *Arabidopsis thaliana*.

1.1 Bedeutung transgener Pflanzen

Das Jahr 1983 markiert einen großen Meilenstein in der Pflanzenbiologie. Vor 21 Jahren wurden der Öffentlichkeit von vier voneinander unabhängig arbeitenden Forschungsgruppen die ersten transgenen Pflanzen präsentiert (Herrera-Estrella *et al.*, Bevan *et al.*, Fraley *et al.*, Murai *et al.*, alle 1983). Gleichzeitig setzte eine intensive gesellschaftspolitische Debatte über potentielle Gefahren und die ethische Vertretbarkeit transgener Pflanzen ein.

Unabhängig davon ist seit der Herstellung der ersten transgenen Pflanzen die Technik der Pflanzentransformation weiterentwickelt worden. Heute ist es möglich, sehr viele Arten mono- und dicotyler Pflanzen zu transformieren. Die Transformation von Pflanzen erfolgt meist über Agrobakterien, jedoch können Pflanzen auch durch andere Methoden wie die Elektroporation oder durch ballistischen Transfer transformiert werden (Newell, 2000, Terzaghi und Cashmore, 1997, Klein *et al.*, 1987, Ye *et al.*, 1990).

Die Transformation von Pflanzen erfolgt aus unterschiedlichen Gründen: Sie wird zur funktionellen Charakterisierung von Genen, für die Optimierung von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, sowie für den Einsatz von Pflanzen als Bioreaktor zur Herstellung von z.B. Polymeren oder rekombinanten Proteinen eingesetzt. Die Verwendung von transgenen Pflanzen als Bioreaktor, die unter dem Oberbegriff „Molecular Farming“ zusammengefasst wird, ist ein relativ junges Forschungsgebiet (Horn *et al.*, 2004, Lessard *et al.*, 2002).

Der Anbau von transgenen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Wurde im Jahr 1996 insgesamt eine Fläche von 1,7 Millionen Hektar weltweit mit transgenen Pflanzen bebaut, war es im Jahr 2003 schon eine Fläche von 67,7 Millionen Hektar (Quelle ISAAA, www.isaaa.org). Bei den angebauten transgenen Pflanzen handelt es sich zum größten Teil um Baumwoll-, Soja-, Raps- und Maispflanzen, die entweder die Cry-Gene aus *Bacillus thuringiensis* oder das Gen für die

Phosphinothricin-N-Acetyltransferase aus *Streptomyces viridochromogenes* (Pat-Gen) bzw. aus *Streptomyces hygroscopicus* (Bar-Gen) enthalten. Die Cry-Gene vermitteln eine Resistenz gegen Insekten, das Bar- bzw. das Pat-Gen eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin. Der Anbau von transgenen Nutzpflanzen erfolgt zur Zeit hauptsächlich in Nord- und Südamerika, aber auch in Südostasien und Australien. Aufgrund der Gesetzgebung wurden in Europa bislang kaum genetisch veränderte Nutzpflanzen angebaut. Eine umstrittene Haftungsregelung könnte den Anbau von transgenen Pflanzen in Deutschland auch in Zukunft erschweren. Es kann aber generell damit gerechnet werden, dass zukünftig gentechnisch veränderte Pflanzen zunehmend für die Züchtung eingesetzt werden.

1.2 Bedeutung von gewebespezifischen Promotoren

Für die Expression eines Transgens ist die Wahl des Promotors von besonderer Bedeutung. Es gibt eine Vielzahl von Promotoren, die sich hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens stark unterscheiden können. Die Auswahl eines Promotors mit einem geeigneten Expressionsprofil erhöht die Chancen auf eine erfolgreiche Herstellung transgener Pflanzen mit den jeweils gewünschten Eigenschaften (Potenza *et al.*, 2004). Als Promotor eines Gens wird derjenige genomische Bereich bezeichnet, der die Expression dieses Gens reguliert. Er befindet sich in der Regel 5' vor dem zu transkribierenden Gen (Pedersen *et al.*, 1999). Für das Expressionsverhalten eines Promotors sind spezifische *cis* regulatorische Promotorelemente verantwortlich (Potenza *et al.* 2004). Neben dem Promoter haben auch andere Faktoren Einfluss auf die Expression eines Gens (Pedersen *et al.*, 1999). Zu diesen Faktoren gehören die Chromatinstruktur in der Umgebung des Gens, die Initiation der Transkription, die Prozessierung des Transkriptes zu mRNA, die Stabilität des Transkriptes sowie die Initiation der Translation. Von besonderer Bedeutung ist jedoch die Initiation der Transkription am Promotor. Transkriptionsfaktoren binden an für sie spezifische Elemente des Promotors und ermöglichen durch zahlreiche koordinative Wechselwirkungen der RNA-Polymerase die Transkription. Die RNA von proteinkodierenden Genen wird in mRNA prozessiert und anschließend in ein Protein translatiert (Tyagi, 2001). Eukaryotische Promotoren setzen sich in der Regel aus den basalen Promotorelementen, aus „upstream control“- sowie aus Enhancer-Elementen zusammen. Die basalen Elemente umfassen in der Regel die TATA-Box, die ca. 25 bp 5' zum Transkriptionsstartpunkt liegt, sowie das Inr-Element am Transkriptionsstartpunkt. Die „upstream control“-Elemente liegen meist in einem Bereich ca. 50 bis 200 bp 5' vom Transkriptionsstart entfernt (Pedersen *et al.*, 1999). Die GC-Box und die CAAT-Box sind häufig Bestandteil dieser Bereiche. Weiterhin befinden sich in diesem Bereich Elemente, die für die spezifische Expression des Promotors verantwortlich sind. In größerer Entfernung (5' oder 3') zu dem zu transkribierenden Gen können sich in *cis*

agierende Enhancer-Bereiche befinden, die auch einen Einfluss auf die Initiation der Transkription haben können (Bellen, 1999).

Da jedes eukaryotische Gen über einen Promotor verfügt, gibt es eine Vielzahl von unterschiedlich regulierten Promotoren. Kriterien für die Auswahl des Promotors für die Expression eines Transgens sind, in welchen Geweben oder unter welchen Bedingungen der Promotor eine Expression vermitteln und wie stark die von ihm vermittelte Expression sein soll. Die Expression eines *in planta* transformierten Gens kann durch eine Vielzahl von Promotoren reguliert werden. Dazu gehören Promotoren, die konstitutiv aktiv, die gewebe- oder entwicklungsspezifisch oder die durch biotische oder abiotische Faktoren induzierbar sind (Lessard *et al.* 2002).

Der bekannteste und in transgenen Pflanzen am meisten eingesetzte Promotor ist der Cauliflower-Mosaik-Virus 35S-Promotor (kurz CaMV 35S Promotor). Er ist nicht eukaryotischen Ursprungs, sondern wurde aus einem pflanzlichen Pathogen, dem Blumenkohlmosaikvirus, isoliert (Ow *et al.*, 1986). In den meisten Geweben von dicotylen und zum Teil auch von monokotylen Pflanzen vermittelt er eine sehr starke konstitutive Expression der mit ihm fusionierten Gene (Benfey *et al.*, 1990a und 1990b).

Weitere biotechnologisch häufig genutzte konstitutiv aktive Promotoren stellen die Promotoren von Actin- bzw. Ubiquitin-Genen aus unterschiedlichen Pflanzen dar. Actin ist eine essentielle Komponente des Cytoskeletts und wird in nahezu allen Zellen exprimiert (An *et al.*, 1996). Ubiquitin spielt eine Rolle bei dem Abbau von Proteinen, in der Struktur des Chromatins sowie bei der Reparatur von DNA und wird wie Actin in fast allen Pflanzenzellen in großen Mengen exprimiert (Potenza *et al.*, 2004, Kawalleck *et al.*, 1993). Beispiele für Actin- bzw. für Ubiquitin-Promotoren sind der Act1-Promotor aus Reis (McElroy *et al.*, 1991) sowie der Ubiquitin-Promoter aus Mais (McElroy und Bretell, 1994). Actin- und Ubiquitin-Promotoren werden hauptsächlich in monokotylen Pflanzen eingesetzt.

Sowohl für die Herstellung der ersten transgenen Nutzpflanzen als auch für das Molecular Farming wurden zunächst fast ausschließlich konstitutiv exprimierende Promotoren eingesetzt. In der Regel handelte es sich dabei um den CaMV 35S Promotor. Jedoch werden seit einigen Jahren anstelle von konstitutiv exprimierenden Promotoren verstärkt Promotoren eingesetzt, die gewebespezifisch bzw. induzierbar sind (Song *et al.*, 2000). Dafür gibt es unterschiedliche Gründe. Gewebespezifische oder induzierbare Promotoren werden mittlerweile oft konstitutiven Promotoren bevorzugt, da eine konstitutive Expression eines in Pflanzen eingebrachten Gens nicht immer erwünscht ist und sogar mit Nachteilen verbunden sein kann (Roy *et al.*, 2000). Wird ein Transgen in einer Pflanze zu stark in einem

bestimmten Gewebe oder Entwicklungsstadium exprimiert, kann das nicht gewünschte Effekte auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze haben (Potenza *et al.*, 2004).

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele dafür, dass sich eine konstitutive Expression eines Transgens negativ auf eine Pflanze ausgewirkt hat, beispielsweise durch verlangsamtes Wachstum (Bowling *et al.*, 1994, 1997) oder durch eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pathogenen (Stuiver und Custers, 2001, Berrocal-Lobo *et al.*, 2002, Potenza *et al.*, 2004). Kasuga *et al.* (1999) zeigten, dass die konstitutive Expression eines durch abiotischen Stress induzierbaren Transkriptionsfaktors das Wachstum der transgenen Pflanzen stark verlangsamt hat. Die Fusionierung des Transkriptionsfaktor mit einem durch Stress induzierbaren Promotors hingegen hatte keinen negativen Effekt auf das Wachstum der transgenen Pflanzen und erhöhte zudem die Resistenz gegen unterschiedliche abiotische Stressfaktoren. Heil und Baldwin (2002) verglichen das Wachstum von transgenen Pflanzen, die Proteine der Pathogenabwehr unter Kontrolle von konstitutiven Promotoren bzw. von gewebespezifischen Promotoren exprimierten. Sie beobachteten, dass Pflanzen mit einer konstitutiven Expression von Pathogenabwehrgenen langsamer wuchsen als Pflanzen, die Pathogenabwehrgene gewebespezifisch exprimierten.

Auch im Molecular Farming werden seit einigen Jahren verstärkt Promotoren eingesetzt, die entweder eine gewebespezifische Expression vermitteln oder die induzierbar sind (Fischer *et al.*, 2004, Padidam, 2003). Hierbei werden bevorzugt Promotoren verwendet, die in pflanzlichen Speicherorganen wie Samen, Knollen oder Speicherwurzeln aktiv sind. Zum einen werden dadurch negative Effekte, die eine Expression des Transgens in anderen Geweben haben könnte, vermieden (z.B. Toxizität). Zum anderen ist es vorteilhaft, das Transgen in einem pflanzlichen Speicherorgan zu exprimieren, weil die Produkte nicht gleich nach der Ernte der Pflanzen aufgearbeitet werden müssen, sondern in dem Speicherorgan für längere Zeit gelagert werden können (Lessard *et al.*, 2002). Proteine, die im Samen exprimiert werden, sind vor proteolytischen Abbau geschützt und können für mehrere Jahre gelagert werden, ohne an Aktivität zu verlieren (Larrick und Thomas, 2001). Auch für rekombinante Proteine, die mit Hilfe eines knollenspezifischen Promotors in Kartoffelknollen synthetisiert wurden, konnte demonstriert werden, dass eine sechsmonatige Lagerung der Knollen keinen Einfluss auf die Stabilität und Funktionalität der Proteine hatte (De Wilde *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu müssen rekombinante Proteine, die blattspezifisch exprimiert werden, möglichst schnell nach der Ernte aus dem Blattmaterial aufgereinigt werden, um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden (Austin *et al.*, 1994). Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von gewebespezifischen Promotoren im Molecular Farming ist, dass sie höhere Produkt-Ausbeuten bewirken können. De Jaeger *et al.* (2002) setzten für die Überexpression eines rekombinanten Antikörpers in *Arabidopsis thaliana* einen samenspezifischen Promotor aus

Phaseolus vulgaris ein und wiesen im Samen fast vierzigmal mehr rekombinanten Antikörper nach als in Vergleichspflanzen, in denen das Transgen mit dem CaMV 35S-Promotor fusioniert worden war.

Da Promotoren modular aufgebaut sind, gibt es seit einigen Jahren Versuchsansätze, synthetische Promotoren zu konstruieren. Dazu werden einzelne Promotorelemente, die ein spezifisches Expressionsverhalten vermitteln, miteinander kombiniert und mit einem Basalpromotor fusioniert (Potenza *et al.*, 2004). Ziel ist es, Promotoren zu kreieren, die hinsichtlich ihres quantitativen und qualitativen Expressionsprofils bedarfsgerechtere Eigenschaften als in der Natur vorkommende Promotoren aufweisen. Für einige Anwendungen sind bereits synthetische Promotoren mit optimierten Eigenschaften, z.B. in Bezug auf die Pathogeninduzierbarkeit, hergestellt worden (Rushton *et al.*, 2002).

Um den Einfluss eines Promotors auf die Expression eines Transgens einschätzen zu können, muss das Expressionsprofil bekannt sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf potentiell wurzelspezifische Promotoren der Zuckerrübe charakterisiert. Die Charakterisierung der fünf Promotoren erfolgte auch in Hinblick auf eine mögliche Anwendung der Promotoren in transgenen Zuckerrüben. In der Literatur ist bisher lediglich ein Promotor beschrieben, der hauptsächlich in der Wurzel der Zuckerrübe aktiv ist (Hesse und Willmitzer, 1996). Bei diesem Promotor handelt es sich um den Promotor der Sucrose-Synthase aus der Zuckerrübe. Neben der Aktivität in der Wurzel vermittelt er aber auch noch eine verminderte Aktivität in anderen Geweben der Zuckerrübe.

1.3 Die Zuckerrübe

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*) gehört zur Familie der Gänsefußgewächse (*Chenopodiaceae*) und innerhalb dieser zur Gattung der *Beta* (Lange *et al.*, 1999). Kennzeichnend für die Zuckerrübe ist ein zweijähriger Lebenszyklus. Im ersten Jahr werden in der Speicherwurzel große Mengen an Saccharose und Stickstoffverbindungen gespeichert. Nach der Überwinterung wird im zweiten Jahr unter Verbrauch der gespeicherten Nahrungsreserven der Blütenstand gebildet, und es werden Samen produziert (Bosemark, 1993). Durch Züchtung konnte der Saccharosegehalt der Wurzel der Zuckerrübe innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums von ca. 200 Jahren von ca. 2 % in der Runkelrübe auf 16-22 % in der heutigen Kulturform gesteigert werden (Schulze und Bohle, 1976, Franke 1997). Die Zuckerrübe ist nach dem Zuckerrohr die zweitgrößte Quelle für Saccharose weltweit. Sie gehört mit einem Anbaugebiet von fast 450.000 ha und einem Ertrag von 23,7 Millionen Tonnen im Jahr 2003 zu den wichtigsten

landwirtschaftlichen Nutzpflanzen in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt, www.destatis.de).

Der Rübenkörper der Zuckerrübe besteht zum größten Teil aus der Hauptwurzel. Ein schmalerer, oberer Bereich des Rübenkörpers geht aus dem Hypokotyl des Keimlings hervor, oberhalb des Hypokotyls befindet sich ein beblätterter Teil, das Epicotyl (Artschwager, 1926). Neben der Verankerung im Boden und der Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen erfüllt die Wurzel der Zuckerrübe eine wichtige Rolle bei der Speicherung der Produkte der Photosynthese. An diese Aufgabe ist die Form der Wurzel morphologisch angepasst. Die Wurzel der Zuckerrübe ist eine fleischige Pfahlwurzel und wird durch sekundäres Dickenwachstum gebildet. Um das ursprüngliche Cambium werden 12-15 sekundäre, ringförmige Cambien ausgebildet. Die sekundären Cambien gehen aus dem Perizykel hervor und sind bereits in der jungen Rübe angelegt (Hayward, 1938, Elliot und Weston, 1993). Durch Differenzierung wird aus jeder einzelnen Cambiumschicht eine ringförmige vaskuläre und eine ringförmige parenchymatische Zone gebildet (Elliot und Weston, 1993). Die vaskulären Zonen bestehen aus Phloem-, Xylem- sowie parenchymatischem Gewebe. Saccharose gelangt als Produkt der Photosynthese von den oberirdischen Pflanzenteilen über das Phloem in die Wurzel und wird in den Vakuolen des parenchymatischen Gewebes gespeichert (Giaquinta, 1983). In den parenchymatischen Zellen der vaskulären Bereiche ist die Saccharosekonzentration am höchsten (Elliot und Weston, 1993).

In den letzten Jahren wurde verstärkt die Bedeutung von Wurzeln für mögliche biotechnologische Anwendungen entdeckt. Neben der Verankerung im Boden, der Speicherung von Stoffen und der Versorgung mit Nährstoffen haben Wurzeln einen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung der Rhizosphäre sowie auf die Interaktionen mit nützlichen und schädlichen Organismen. Diese Aufgabenvielfalt macht die Wurzeln für genetische Modifikationen interessant (Bucher, 2002). Um diese Modifikationen vornehmen zu können, werden Promotoren benötigt, die eine Expression eines Transgens in der Wurzel vermitteln.

Welche Vorteile hätte ein wurzelspezifischer Promotor der Zuckerrübe und für welche Anwendungen könnte er eingesetzt werden? Die Möglichkeiten, einen wurzelspezifischen Promotor einzusetzen, sind enorm vielfältig. Ein wurzelspezifischer Promotor kann beispielsweise eingesetzt werden, um den Zuckerverlust während der Lagerung von Zuckerrüben nach der Ernte zu reduzieren. Nach der Ernte von Zuckerrüben schließt sich in der Regel die Aufarbeitung der Zuckerrüben nicht sofort an, da die Kapazitäten der Fabriken, die die Saccharose aus den Rüben aufreinigen, begrenzt sind. Deshalb werden die

Zuckerrüben in Deutschland durchschnittlich 30 Tage gelagert, ehe sie aufgearbeitet werden (Quelle Südzucker, www.suedzucker.de). Da die gelagerten Zuckerrüben aber trotzdem noch stoffwechselaktiv sind, wird ein Teil der gespeicherten Saccharose durch Sucrose-Synthasen sowie saure und basische Invertasen metabolisiert (Klotz *et al.*, 2003). Der Zuckerverlust beträgt ca. 0,1 % der gespeicherten Saccharose pro Tag (Quelle Südzucker). Ein Ansatzpunkt, diesen Zuckerverlust zu reduzieren, ist, dass Invertasen durch Invertase-Inhibitoren gehemmt werden können (Greiner *et al.*, 1999). Ein wurzelspezifischer Promotor könnte somit z. B. mit einem Invertase-Inhibitor fusioniert werden. Durch den Einsatz eines gewebespezifischen Promoters könnten eventuell auftretende unerwünschte Effekte vermieden werden, die eine konstitutive Expression des Promotors in der Pflanze bewirken könnte.

Weiterhin könnten wurzelspezifische Promotoren auch dazu eingesetzt werden, um die Resistenz der Pflanze gegen schädliche Organismen zu erhöhen. Zu den schädlichen Organismen zählen pflanzenpathogene Mikroorganismen wie Viren, Pilze oder Bakterien, aber auch tierische Schädlinge wie Nematoden. Da Wurzeln einer Pflanze in direktem Kontakt mit dem umgebenden Boden stehen, sind sie dem Befall von Pathogenen besonders stark ausgesetzt. Die wirtschaftlich den größten Schaden verursachenden Schädlinge für die Zuckerrübe sind der Pilz *Cercospora beticola*, der die *Cercospora* Blattfleckenkrankheit auslöst, der Virus BNYVV (Beet necrotic yellow vein virus), der von dem Bodenpilz *Polymyxa betae* auf die Zuckerrübe übertragen wird und die Wurzelbärtigkeit (Rizomania) auslöst, sowie die Rübenzystennematode *Heterodera schachtii* (Hoffmann und Schmutterer, 1999). Zwei dieser drei wirtschaftlich sehr relevanten Schädlinge, das BNYV-Virus sowie die Rübenzystennematode, aber auch zahlreiche weitere Pathogene befallen die Zuckerrübe über die Wurzel. Ein Promotor, der in der Wurzel und nicht in den anderen Geweben der Zuckerrübe aktiv ist, wäre daher für die Expression von Pathogenabwehrgenen in der Zuckerrübe geeignet. Auch für diesen Ansatz könnten durch die gewebespezifische Expression unerwünschte Effekte, die eine konstitutive Expression von Pathogenabwehrgenen auf die Pflanze haben könnte, vermieden werden (Heil und Baldwin, 2002).

Weiterhin könnten die Promotoren für das Molecular Farming eingesetzt werden. Bisher werden in der Literatur kaum Ansätze beschrieben, in denen die Zuckerrübe für Molecular Farming eingesetzt worden ist. Jedoch sind unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten vorstellbar, wie zum Beispiel die Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose durch die wurzelspezifische Expression einer bakteriellen Sucrose-Isomerase. Palatinose wird in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff eingesetzt. Börnke *et al.* (2002a und b) stellten Palatinose in Knollen transgener Kartoffeln her. Für die Expression der Sucrose-Isomerase wurde ein knollenspezifischer Promotor eingesetzt, da ein konstitutiver Promotor einen

negativen Einfluss auf den Phänotyp der transgenen Pflanzen hatte. Die Zuckerrübe könnte für die Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose besser geeignet sein, da in der Zuckerrübenwurzel das Substrat Saccharose in einer sehr hohen Konzentration vorliegt. Weiterhin könnte ein wurzelspezifischer Promotor für die Synthese von Polyfructanen eingesetzt werden (Sevenier *et al.*, 1998).

Die fünf potentiell wurzelspezifischen Promotoren, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden, gehören zu Genen, die durch zwei Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)-Experimente isoliert worden sind (Kloos *et al.*, 2002, Kloos und Hehl, pers. Mitteilung). Bei einer SSH werden zwei in cDNA umgeschriebene mRNA-Populationen gegeneinander mit dem Ziel subtrahiert, Gene anzureichern, die nur in einer der beiden mRNA-Populationen vorliegen und somit spezifisch exprimiert werden (Diatchenko *et al.*, 1996).

Vier der fünf untersuchten Promotoren gehören zu Genen aus einer Subtraktion, bei der mRNA aus der Wurzel der Zuckerrübe gegen mRNA aus Blättern subtrahiert worden ist (Kloos *et al.*, 2002). Bei den isolierten Genen handelt es sich um die Gene BvHis1-r, BvMII, BvTlp1 und BvSmp. BvHis1-r (Histon 1-root, Laborbezeichnung 2-1-47) ist homolog zu durch Trockenstress induzierbaren Linker-Histon-Varianten aus unterschiedlichen Organismen wie *Lycopersicon pennellii* und *Arabidopsis thaliana* (Wei und O'Connell, 1996, Ascenzi und Gantt, 1999). BvMII (Major-latex-like, Laborbezeichnung 2-1-48) ist homolog zu einem Major-Latex-Protein-Homolog aus *Mesembryanthemum crystallinum*. BvTlp1 (Thaumatococcus-like-protein, Laborbezeichnung 2-1-88) zeigt die höchste Homologie zu Thaumatococcus-like Proteinen aus zahlreichen Organismen. Das Genprodukt von BvSmp (Small protein) zeigt keine Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion, hat aber einen 92 Aminosäuren langen offenen Leseraster.

Einer der fünf untersuchten Promotoren stammt von einem Gen, das durch eine SSH isoliert worden ist, bei der mRNA aus gelagerten Zuckerrübenwurzeln gegen mRNA aus Blattmaterial von frisch geernteten Zuckerrüben subtrahiert worden ist (Kloos und Hehl, pers. Mitteilung). Bei dem isolierten Gen handelt es sich um BvTlp2 (Thaumatococcus-like-protein, Laborbezeichnung LWF05), das wie BvTlp1 eine hohe Homologie zu Thaumatococcus-like Proteinen aufweist. Abb. 1 zeigt das Ergebnis einer Northern-Blot-Analyse, in der RNA aus unterschiedlichen Geweben der Zuckerrübe mit cDNA-Fragmenten der beschriebenen Gene hybridisiert worden ist (Kloos *et al.* 2002, Kloos und Hehl, pers. Mitteilung). Die Promotoren dieser Gene lagen zu Beginn der Arbeit bereits vor (BvSmp und BvMII: Europäisches Patent EP1207204; BvTlp1 und BvHis1-r: Oltmanns und Hehl, unveröffentlicht; BvTlp2: Kloos und Hehl, pers. Mitteilung).

Ziel der Arbeit war eine Expressionsanalyse der Promotoren der durch die zwei SSHs isolierten fünf Gene. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet: Vermitteln die Promotoren tatsächlich in der Zuckerrübe eine gewebespezifische Expression? Und wenn ja, wo genau ist diese Expression in der Wurzel lokalisiert und wie stark ist die Expression? Die Beantwortung dieser Fragen ist notwendig, um Aussagen über die biotechnologische Verwendbarkeit der charakterisierten Promotoren in transgenen Zuckerrüben machen zu können.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welches Expressionsprofil die Promotoren in einem heterologen System, in Tabak, haben. Vermitteln die Promotoren in Tabak ein ähnliches Expressionsprofil wie in der nur entfernt verwandten Zuckerrübe?

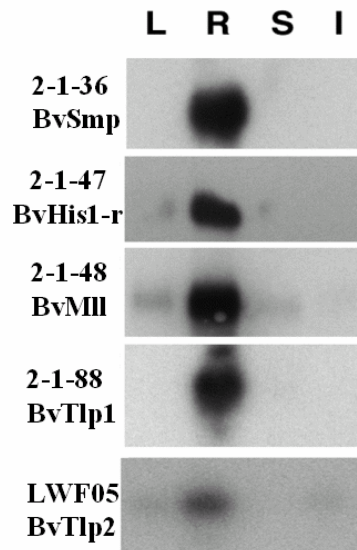


Abb. 1. Northern-Blot-Analyse mit cDNA-Fragmenten von verschiedenen wurzelspezifischen Genen der Zuckerrübe mit RNA aus unterschiedlichen Geweben der Zuckerrübe. RNA aus Blatt (L), Wurzel (R), Spross (S) und Infloreszenz (I) der Zuckerrübe wurde mit den angegebenen Fragmenten hybridisiert. Die Fragmente hybridisieren jeweils spezifisch mit aus der Wurzel der Zuckerrübe aufgereinigter RNA.

Bei einem der Gene aus der Zuckerrübe, dessen Promotor im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurde, handelt es sich um ein Linker-Histon, auch genannt Histon H1. Höhere Eukaryoten exprimieren unterschiedliche Linker-Histon-Varianten. Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob Linker-Histone essentiell sind und welche Bedeutung die Existenz unterschiedlicher Linker-Histon-Varianten hat (Ausio, 2000). Um einen Beitrag zur Beantwortung dieser Fragen zu leisten, wurden die Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* untersucht.

1.4 Core- und Linker-Histone

Das eukaryotische Genom liegt nicht frei im Zellkern vor, sondern verpackt in Form eines Komplexes aus DNA mit DNA-bindenden Proteinen (van Holde, 1989). Dieser Komplex wird als Chromatin bezeichnet. Histone bilden die Hauptproteinkomponente des Chromatins. Es gibt die vier Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 sowie das Linker-Histon H1 (bzw. H5). Jeweils zwei Kopien der vier Core-Histone bilden einen oktameren Histonkomplex, um den die DNA mit einer Länge von ca. 140 bis 180 bp in fast zwei vollständigen linksgängigen superhelikalen Windungen gewickelt ist. Dieser Komplex wird als Nukleosom bezeichnet (Felsenfeld, 1996, Workman und Kingston, 1998). Die Nukleosomen sind durch 15-55 bp lange Linker-DNA miteinander verknüpft (Luger *et al.*, 1997).

Linker-Histone (H1) sind an der Oberfläche der Nukleosomen lokalisiert. Dabei binden sie sowohl an das Core-Partikel sowie an die Linker-DNA. *In vitro* vermittelt das Linker-Histon H1 die Ausbildung der 30 nm-Struktur (Alami *et al.*, 2003). Es wird allgemein davon ausgegangen, dass Linker-Histone auch *in vivo* an der Ausbildung dieser Chromatin-Struktur beteiligt sind. Linker-Histone werden außerdem für einen allgemeinen Repressor der Transkription gehalten, der den Zugang von Transkriptionsfaktoren und Chromatin remodulierender Proteinkomplexe wie SWI/SNF an ihre spezifischen Bindestellen verhindert. Andererseits zeigen einige, neuere Studien, dass dies nicht der Fall ist und H1 nur Einfluss auf die Expression weniger Gene hat (Harvey *et al.*, 2004, Hellauer *et al.*, 2001).

Die Aminosäurezusammensetzung der Linker-Histone unterscheidet sich von der der Core-Histone. Trotz der gleichen Nomenklatur der (Linker- und Core-) Histone wird angenommen, dass sich Linker-Histone und Core-Histone voneinander unabhängig entwickelt haben und somit einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung haben (Kasinsky *et al.*, 2001). Linker-Histone sind vermutlich aus einem DNA-bindenden und lysinreichen basischen Protein aus Archaeobakterien hervorgegangen, während Core-Histone wahrscheinlich eubakteriellen Ursprungs sind. Kasinsky *et al.* (2001) vermuten, dass die beiden Proteingruppen durch lateralen Gentransfer in Proto-Eukaryoten vereinigt wurden.

Die beiden Core-Histone H3 und H4 gehören zu den evolutionär am höchsten konservierten Proteinen. Die H4 Histone von Erbse und Kuh unterscheiden sich beispielsweise nur in zwei Aminosäureresten (Delange *et al.*, 1969). Ferner sind die beiden anderen Core-Histone H2A und H2B auch hoch konserviert, jedoch sind sie ca. zehnmal divergenter als H3 und H4. Der hohe Grad der Konservierung der Core-Histone spiegelt ihre große Bedeutung wieder. Core-Histone sind essentiell und spielen in der Regulation der Genexpression eine zentrale Funktion (Iizuka und Smith, 2003, Strahl und Allis, 2000).

Die N-Termini der Core-Histone können posttranslational durch Acetylierung von Lysinresten, Methylierung von Arginin- und Lysinresten, Phosphorylierung von Serinresten sowie Ubiquitinierung von Lysinresten modifiziert werden (Berger und Gaudin, 2003). Diese Modifikationen können spezifisch die Chromatinfunktion beeinflussen. Zum einen ändern diese Modifikationen die Ladung der Core-Histone. Dies hat Einfluss auf die Struktur der Core-Histone bzw. des Chromatins sowie auf die Bindung der Core-Histone an die DNA. An freigelegte DNA-Bereiche können positiv oder negativ regulierende Transkriptionsfaktoren binden (Iizuka und Smith, 2003). Zum anderen können diese Modifikationen spezifische Bindungsstellen für andere Proteine schaffen, wodurch funktionelle Proteinkomplexe rekrutiert werden können. Beispielsweise binden Proteine, die eine Bromodomäne bzw. eine Chromodomäne enthalten, spezifisch an acetylierte bzw. methylierte Lysinreste (Strahl und Allis, 2000).

Die einzelnen Mechanismen, die zur Modifikation der Chromatinstruktur führen, sind in Eukaryoten weitestgehend konserviert (Berger und Gaudin, 2003). Die vielfältigen Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikationen der Core-Histone und die damit verbundenen unterschiedlichen, aber spezifischen Regulationsprozesse im Zellkern haben zur Postulierung der Histon-Code-Hypothese geführt (Strahl und Allis, 2000). Danach vermitteln spezifische Kombinationen von Histon-Modifikationen einen Code, der von anderen Proteinen erkannt wird.

Die Aminosäuresequenz der Linker-Histone ist verglichen mit der der Core-Histone nur schwach konserviert. Allerdings ist die Struktur der Linker-Histone konserviert. Sie besteht in Eukaryoten in der Regel aus drei Domänen: Einem kurzen N-Terminus, einer zentralen, globulären Domäne mit einem für Linker-Histone typischen „winged Helix“-Motiv, sowie einem längeren, lysinreichen C-Terminus (Ramakrishnan *et al.*, 1993). Eine Ausnahme stellt das Linker-Histon aus *Saccharomyces cerevisiae* dar, das über zwei globuläre Domänen verfügt (Hellauer *et al.*, 2001). Die C-Termini und N-Termini der Linker-Histone unterscheiden sich in ihrer Länge sowie in ihrer Aminosäurezusammensetzung sowohl zwischen den verschiedenen Linker-Histon-Varianten eines Organismus als auch zwischen den Linker-Histon-Untereinheiten unterschiedlicher Organismen (Harvey *et al.*, 2004).

In vitro Versuche zeigen, dass die zentrale globuläre Domäne an die Oberfläche von Nukleosomen bindet, der C-Terminus aber vermutlich für die Kondensation des Chromatins notwendig ist (Vermaak *et al.*, 1998, Crane-Robinson, 1997, Hendzel *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die positiv geladenen Lysinreste der C-terminalen Domänen an die DNA binden und durch die damit verbundene Neutralisierung der negativ geladenen Phosphatreste des DNA-Doppelstranges eine Kondensation des Chromatins ermöglichen („Charge patch“-Hypothese, Hendzel *et al.*, 2004).

In „Photobleaching“-Experimenten untersuchten Misteli *et al.* (2000) die Dynamik der Bindung von Linker-Histonen an das Chromatin in Maus-Fibroblasten und fusionierten eine H1 Variante mit GFP. In diesen Experimenten wurde nachgewiesen, dass fast das gesamte exprimierte H1-GFP an das Chromatin gebunden war. Weiterhin wurde gezeigt, dass es sich bei der Bindung von H1-GFP an Chromatin um einen dynamischen Prozess handelt. Das heißt, dass sich die H1-GFP-Moleküle nach einer bestimmten Verweilzeit von der Chromatinstruktur lösen, um anschließend wieder an eine unbesetzte Stelle an das Chromatin zu binden. In hyperacetyliertem Chromatin, ein Zustand der mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität in Verbindung gebracht wird, sank die durchschnittliche Verweilzeit der H1-GFP-Moleküle an einer Bindungsstelle.

In einer neueren Studie zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass Linker-Histone mit Proteinen der High-Mobility-Group (HMG) um Bindungsstellen innerhalb des Chromatins kompetieren (Catez *et al.*, 2004). Eine Erhöhung des absoluten HMG-Gehaltes im Zellkern ging mit einer Reduzierung der an das Chromatin gebundenen Linker-Histone einher. HMG-Proteine gehören zu den Nichthiston-Bestandteilen des Chromatins, sind jedoch mit den Linker-Histonen verwandt (Ner *et al.*, 2003). Die Funktion der HMG-Proteine ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass HMG-Proteine im Gegensatz zu den Linker-Histonen die Chromatinstruktur dekondensieren. Durch die Dekondensation wird vermutlich Transkriptionsfaktoren ein besserer Zugang zur DNA ermöglicht (Misteli *et al.*, 2000).

Da der absolute Gehalt an HMG-Proteinen im Zellkern entwicklungs- bzw. gewebeabhängig ist und somit im Gegensatz zum absoluten H1-Gehalt stark schwankt, vermuten Catez *et al.* (2004), dass durch eine Erhöhung des HMG-Protein-Gehalts im Zellkern die Menge der an das Chromatin gebundene Linker-Histone reduziert wird (und umgekehrt). Dadurch könnte sich die Affinität von positiv oder negativ regulierenden Transkriptionsfaktoren zu ihren spezifischen Bindungsstellen erhöhen.

Eine Eigenschaft von Linker-Histonen ist ihre Heterogenität. In zahlreichen höheren Eukaryoten wie Tieren und Pflanzen wird nicht nur ein Linker-Histon exprimiert, sondern mehrere Varianten bzw. Subtypen (Parseghian und Hamkalo, 2001). Zwar gibt es mit

Ausnahme von H4 auch unterschiedliche Varianten der Core-Histone, jedoch ist die Variabilität der Core-Histone wesentlich schwächer ausgeprägt als die der Linker-Histone.

Arabidopsis thaliana verfügt über die drei Linker-Histon-Varianten His1-1, His1-2 und His1-3 (Ascenzi *et al.*, 1999). In Tabak wurde die Existenz von mindestens sechs Linker-Histon-Varianten nachgewiesen (Prymakowska-Bosak *et al.*, 1999), in Mammalia wie in der Maus gibt es mindestens acht unterschiedliche Linker-Histon-Varianten (Alami *et al.*, 2003).

Bisher ist noch nicht geklärt, welche Funktion die Varianz der Linker-Histone haben könnte bzw. welche Funktion die einzelnen Subtypen haben. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob Linker-Histone überhaupt essentiell sind (Ausio, 2000).

Niedere Eukaryoten verfügen lediglich über einen H1 Subtyp. Bisher ist in drei niederen Eukaryoten der jeweils einzige H1 Subtyp eliminiert worden: in den beiden einzelligen Eukaryoten *Tetrahymena thermophila* (Shen *et al.*, 1995) und *Saccharomyces cerevisiae* (Hellauer *et al.*, 2001), sowie in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* (Ramon *et al.*, 2000). Die Organismen waren lebensfähig und wiesen nur minimale phänotypische Änderungen, verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp, auf.

Für die Knock-outs von H1 in der Hefe bzw. in *Tetrahymena* wurde weiterhin untersucht, ob sie einen Einfluss auf die Expression anderer Gene haben (Shen *et al.*, 1996, Hellauer *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass der Knock-out von H1 einen sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Expression einiger Gene hatte, jedoch blieb das Expressionsverhalten der meisten Gene unverändert. In der Hefe war lediglich die Transkription von 26 der insgesamt 6000 Gene um den Faktor zwei oder mehr verändert. Die Transkriptmengen der meisten der 26 betroffenen Transkripte waren reduziert (Hellauer *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse sind insofern überraschend, da dies bedeutet, dass H1 in Hefen eher als Aktivator denn als Repressor fungiert (Harvey und Downs, 2004).

Pflanzliche Linker-Histone werden nach ihrer Größe in zwei Klassen unterteilt (Scippa *et al.*, 2004). Die erste Gruppe enthält die größeren Histon H1 Varianten. Zu dieser Gruppe gehören His1-1 und His1-2 aus *Arabidopsis thaliana*. His1-3 wird in die zweite Gruppe eingeordnet, die die kleineren, unter physiologischen Bedingungen weniger stark positiv geladenen Varianten umfasst. Für einige, zueinander homologe Linker-Histone der zweiten Gruppe wurde gezeigt, dass sie durch Trockenstress induzierbar sind. Dabei handelt es sich um His1-3 aus *Arabidopsis thaliana* (Ascenzi und Gantt, 1997), His1-S aus *Lycopersicon esculentum* (Scippa *et al.* 2000) und His1-D aus *Lycopersicon pennellii* (Wei und O'Connell, 1996). Diese drei Gene enthalten in ihrem Promotor ein Abscisinsäure-Response-Element, durch das vermutlich die Induktion durch Trockenstress verursacht wird. Das wurzelspezifische Linker-Histon aus der Zuckerrübe His1-r, dessen Promoter im Rahmen

dieser Arbeit untersucht wurde, ist homolog zu diesen Linker-Histon-Varianten (Kloos *et al.*, 2002).

Die Funktion der trockeninduzierbaren Linker-Histon-Varianten ist noch nicht geklärt. In Versuchen, in denen der Gehalt an His1-S in *Lycopersicon esculentum* beziehungsweise von H1-3 in *Arabidopsis thaliana* durch einen Antisense-Ansatz reduziert worden war, entwickelten sich die Pflanzen normal. Dies legt nahe, dass die trockeninduzierbaren Linker-Histon-Varianten keine wichtige Rolle bei der Pflanzenentwicklung spielen (Scippa *et al.*, 2004, Ascenzi und Gantt, 1999). *Arabidopsis*-Pflanzen, die ein Antisense-Konstrukt gegen His1-3 tragen, wurden auf Unterschiede hinsichtlich der Reaktion auf Trockenstress untersucht, jedoch zeigten die Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp keinen abweichenden Phänotyp. Gene, deren Expression sich unter Trockenstress ändert, zeigten ebenfalls kein verändertes Expressionsverhalten in His1-3-Antisense-Linien. Dies bedeutet, dass AtHis1-3 vermutlich keinen spezifischen Einfluss auf die Regulation der Expression dieser Gene hat (Ascenzi und Gantt, 1999).

Die einzigen Versuche, in denen in Pflanzen der Gehalt der größeren Linker-Histon-Varianten verändert wurde, wurden in Tabak vorgenommen (Prymakowska-Bosak *et al.*, 1999). Tabak besitzt wie *Arabidopsis thaliana* zwei größere Linker-Histon-Varianten (Bezeichnung: His1a und His1b). Prymakowska-Bosak *et al.* (1999) reduzierten durch die Transformation eines Antisense-Konstruktes den Gehalt an His1a und His1b. Jedoch wurde die Reduktion des Gehaltes der größeren Linker-Histon-Varianten durch eine verstärkte Expression der vier kleineren Linker-Histon-Varianten kompensiert. Der Versuch zeigte allerdings, dass in Tabak die großen Linker-Histone einen Einfluss auf die Blütenentwicklung und die Pollenbildung haben. Die Morphologie der Blüten änderte sich im Vergleich zum Wildtyp, in der männlichen Gametogenese wurden Aberrationen beobachtet.

Weitaus mehr Versuche als für Pflanzen wurden zur Aufklärung der Funktion von Linker-Histon-Varianten in Mammalia vorgenommen, besonders in der Maus. In der Maus gibt es mindestens 8 Linker-Histon-Varianten. Die somatischen Varianten His1a, 1b, 1c, 1d und 1e werden ubiquitär, jedoch unterschiedlich stark in verschiedenen Geweben exprimiert (Lennox und Cohen, 1983, Wang *et al.*, 1997). Die beiden Linker-Histone H1t und H1oo werden gewebespezifisch in Spermatocyten bzw. Oocyten während der Meiose gebildet (Lennox und Cohen, 1984, Tanaka *et al.* 2001). H1 (0) wird in differenzierten Zellen exprimiert, die sich nicht mehr teilen (Zlatanova und Doenecke, 1994, Alami *et al.*, 2003). Es ist homolog zu dem Linker-Histon H5 aus Vögeln und Reptilien, die spezifisch in den Erythrocyten exprimiert werden, wo das Chromatin sehr stark kondensiert und die Transkription inaktiv ist (Affolter *et al.* 1987).

Auch für die Maus ist noch nicht bekannt, ob die Heterogenität der Linker-Histon-Varianten mit einer spezifischen Funktion verknüpft ist (Fan *et al.*, 2003). Weiterhin ist die Funktion der einzelnen Subtypen trotz einer sehr großen Anzahl an durchgeführten Experimenten noch weitestgehend ungeklärt. Knock-out-Linien für einzelne Varianten zeigten keine im Vergleich zum Wildtyp abweichenden Phänotypen (Sirotkin *et al.*, 1995, Lin *et al.*, 2004, Rabini *et al.*, 2000, Fan *et al.*, 2001). Jedoch wurde wie in Tabak der Verlust einer Linker-Histon-Variante teilweise durch die verstärkte Expression anderer Varianten kompensiert.

Der Nachweis, dass H1 Histone einen Einfluss auf die Entwicklung der Maus haben, gelang erst vor kurzem (Fan *et al.*, 2003). Durch Kreuzung einzelner Linker-Histon Knock-out-Linien wurden die Gene für die drei somatischen H1 Subtypen H1c, 1d und 1e inaktiviert und somit der Gesamtgehalt an H1 Histon im Vergleich zum Wildtyp um 50 % reduziert. Embryonen, denen diese drei Subtypen fehlten, wiesen zahlreiche Defekte auf und waren nicht lebensfähig. Mäuse, die lediglich zwei der genannten Subtypen nicht exprimierten, waren lebensfähig. Deshalb wird vermutet, dass der Verlust von zwei Linker-Histon-Varianten noch durch die übrigen kompensiert werden kann (Fan *et al.*, 2003). In einem späteren Versuchsansatz wurden die Gene für H1a und der in Spermatozyten exprimierte Variante H1t inaktiviert (Lin *et al.*, 2004). Auch bei diesem Knock-out dieser zwei H1 Subtypen wurde kein abweichender Phänotyp beobachtet.

Neuere Ergebnisse zeigen, dass H1 Varianten in Zellen spezifischere Funktionen haben können als die ihnen ursprünglich zugeordneten. Konishi *et al.* (2003) wiesen beispielsweise nach, dass ein H1 Subtyp in Ratten in der Signalübertragung vom Zellkern zu den Mitochondrien bei der durch DNA-Schäden hervorgerufenen Apoptose eine Rolle spielt.

In einer neueren Veröffentlichung konnte erstmals gezeigt werden, dass ein H1 Subtyp Einfluss auf die spezifische Expression eines Gens hat (Lee *et al.*, 2004). Das somatische Histon H1b der Maus reprimiert gemeinsam mit dem DNA-bindenden Protein Msx1 spezifisch die Expression des MyoD-Gens. MyoD ist ein Transkriptionsfaktor mit einem bHLH-Motiv und stellt einen Master-Regulator für die Entwicklung der Skelettmuskulatur dar. Er bindet an regulatorische Sequenzen zahlreicher Gene für die Differenzierung von Muskelzellen und aktiviert die Transkription dieser Gene (Weintraub *et al.*, 1991). Lee *et al.* (2004) zeigten, dass der Transkriptionsfaktor Msx1 an den Enhancer des MyoD-Gens bindet und mit H1b einen Komplex bildet. Der gebildete H1b-Msx1-Komplex reprimiert die Expression von MyoD und inhibiert die Muskelzelldifferenzierung. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass nach Bindung dieses Komplex an das Chromatin die Core-Histone in der Umgebung des Enhancers Modifikationen aufweisen, wie sie typisch für reprimiertes Chromatin sind. Eine Suppression der Expression von H1b bewirkte, dass Msx1 die Differenzierung von Muskelzellen nicht mehr inhibieren konnte. Die Ergebnisse von Lee *et al.* (2004) sind

überraschend und könnten von großer Bedeutung für die zukünftige Funktionsanalyse von Linker-Histonen sein, weil in diesem Fall gezeigt worden ist, dass das Linker-Histon zunächst nicht an die Chromatinstruktur bindet, sondern erst von einem DNA bindenden Faktor rekrutiert wird (Cirillo und Zaret, 2004).

Abgesehen von diesem Beispiel kann zusammenfassend gesagt werden, dass die genaue Funktion von Linker-Histonen bisher noch nicht geklärt ist. Weiterhin ist auch noch nicht bekannt, warum höhere Eukaryoten über unterschiedliche Linker-Histon-Varianten verfügen, die teilweise unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* untersucht. *Arabidopsis thaliana* wurde als Organismus für diese Analysen ausgewählt, da einerseits das Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bekannt und annotiert ist (*Arabidopsis* Genom Initiative, 2000), andererseits *Arabidopsis thaliana* mit insgesamt drei Linker-Histonen nur über wenige H1 Subtypen verfügt.

Für die Analyse der Funktion der H1 Varianten sollten diese zunächst einzeln über einen PTGS-Ansatz (Posttranskriptionelles Gen Silencing) gesilenced werden, anschließend wurden ausgewählte transgene Linien miteinander gekreuzt, um alle drei Varianten zu silencen. Die transgenen Pflanzen sollten Rückschlüsse auf die Funktion von H1 Histonen ermöglichen und die Fragestellung beantworten, ob Linker-Histone in Pflanzen essentiell sind. Weiterhin dienten die Experimente der Bearbeitung der Fragestellung, inwiefern es möglich ist, eine ganze Genfamilie über einen PTGS-Ansatz zu silencen.

Zur Bestimmung der Expressionsprofile der einzelnen Varianten und zum Vergleich der Expressionsprofile untereinander wurden die Promotorbereiche der einzelnen H1 Subtypen mit einem Reportergen fusioniert und *in planta* transformiert. Bisher sind bezogen auf höhere Eukaryoten nur die Expressionsprofile von Linker-Histon-Varianten in Säugern umfassend untersucht worden, nicht aber für Pflanzen.

1.5 Posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde RNA-Silencing als Methode eingesetzt, um sequenzspezifisch die Expression der drei Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana* zu reduzieren. Die Reduzierung der Expression dieser Gene sollte Rückschlüsse auf die Funktion der Gene erlauben.

In Pflanzen wurde das Phänomen des RNA-Silencings zunächst unter den Begriffen Cosuppression bzw. Posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS) beschrieben, in Pilzen unter dem Begriff Quelling und in Vertebraten bzw. Invertebraten unter dem Begriff RNA-Interferenz (Napoli *et al.* 1990, van der Krol, *et al.*, 1990, Fire *et al.*, 1998). Inzwischen steht

fest, dass es sich beim RNA-Silencing um einen weitestgehend konservierten Mechanismus handelt (Susi *et al.*, 2004).

Das RNA-Silencing wird durch doppelsträngige RNA induziert. Eine zur RNase III-Familie gehörende dsRNA-spezifische Nuklease, der Dicer, degradiert doppelsträngige RNA in kleinere, 21-23 bp lange doppelsträngige RNA-Fragmente. Diese kleinen dsRNA-Fragmente werden als siRNAs bezeichnet (small interfering RNAs). Die siRNAs binden an einen Komplex, der unter anderem Endonukleasen enthält, und bilden so den RISC-Komplex (RNA induced silencing complex). Zur Aktivierung des RISC-Komplexes wird die siRNA unter Verbrauch von ATP entwunden. Der Antisensestrang der siRNA hybridisiert anschließend, falls vorhanden, mit komplementärer mRNA, die durch Nukleasen des RISC-Komplexes degradiert wird. In der Natur dient das RNA-Silencing u.a. der Abwehr von viralen Pathogenen. Einige Viren haben Mechanismen entwickelt, um den Abbau der viralen RNA zu verhindern. In der Molekularbiologie ist das RNA-Silencing eine Methode, die eingesetzt wird, um sequenzspezifisch die Expression von Genen zu reduzieren (Hammond *et al.*, 2001, Sharp, 2001, Hutvagner und Zamore, 2002, Susi *et al.*, 2004, Waterhouse *et al.*, 2001).

Für das Silencen der drei Linker-Histon-Varianten *in planta* wurden ihp-Konstrukte eingesetzt, die für doppelsträngige RNA („hairpin“-RNA) kodieren (intron-containing hairpin RNA).

DsRNA-Konstrukte allgemein enthalten hintereinander jeweils den Bereich der Zielsequenz in Sense bzw. Antisense-Orientierung (Chuang *et al.*, 2000). Besonders effektiv wird ein Zielgen reprimiert, wenn ein funktionelles Intron als Linker zwischen dem Sense- und dem Antisensebereich eingesetzt wird (Varsha-Wesley *et al.*, 2001). Diese Konstrukte werden als ihp-RNA-Konstrukte bezeichnet.

Die Ursache dafür, dass ein funktionelles Intron die Effizienz des Silencings erhöht, ist noch nicht eindeutig bekannt, jedoch wird vermutet, dass durch das Herausspicen des Introns der Sense- und Antisense-Arm in räumliche Nähe gebracht werden, was die Ausbildung von doppelsträngiger RNA begünstigen kann (Helliwell und Waterhouse, 2003).

Das RNA-Silencing ist keine Knock-out-Technologie, da die Expression eines Gens nicht vollständig reduziert wird. Pflanzen, die ein dsRNA-Konstrukt enthalten, werden im Rahmen dieser Arbeit deshalb als Knock-down bezeichnet.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Biosciences, Biomol, Bio-Rad, Duchefa, Fluka, Merck, Serva, Sigma, Riedel De Haen und Roth bezogen. Die Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) lieferte die Radiochemikalien. Die zur Modifikation von DNA eingesetzten Enzyme wurden von den Firmen Fermentas, Invitrogen, Promega, Qbiogene und Stratagene bezogen.

2.2 Kits

Folgende Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

Name	Hersteller	Bestellnummer
AutoRead™ Sequencing Kit	Pharmacia Biotech	#27-2690-02
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences	#RPN2135
HexaLabel™ DNA Labeling Kit	Fermentas	#70042
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel	#740588.250
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel	#740590.250
NucleoSpin® Plant	Macherey-Nagel	#740570.10
NucleoSpin® RNA Plant	Macherey-Nagel	#740949.50
NucleoBond® AX-100	Macherey-Nagel	#740573.100
Luciferase-Assay-System	Promega	#E1501
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	#27106
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	#28704
TA Cloning® Kit	Invitrogen	#K2000-J10
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen	#28106
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	#27106
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	#28704
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas	#K1622

2.3 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

Bezeichnung	Beschreibung/Verwendung	Referenz
pCR2.1	T/A-Klonierung, Sequenzierung	Invitrogen
pBluescript SK+ (pBSK+)	Klonierung, Sequenzierung	Stratagene
pQE30	Überexpression in <i>E. coli</i>	Qiagen

Fortsetzung

Bezeichnung	Beschreibung/Verwendung	Referenz
pGUS3	enthält GUS-Gen aus <i>E. coli</i>	Köhler <i>et al.</i> (1995)
JE3-pBT-35S-LUC-m3	enthält LUC-Gen aus <i>Photinus pyralis</i>	Dietmar Stahl, Einbeck, pers. Mitteilung
pOCA28	binärer Transformationsvektor	Olszewski <i>et al.</i> (1988) Honma <i>et al.</i> (1993)
pGPTV-Bar	binärer Transformationsvektor	Becker <i>et al.</i> (1992)
pVKH-35S-pA1	binärer Transformationsvektor	Reintanz (1997); K. Palme, MDL Köln; pers. Mitteilung
pART27	binärer Transformationsvektor	Varsha-Wesley <i>et al.</i> (2001)
pVKI-Gal4.r	binärer Transformationsvektor	D. Großkopf, MDL Köln; pers. Mitteilung

Folgende Derivate von pBSK+ mit den Promotorbereichen aus der Zuckerrübe lagen vor:

Laborbezeichnung/Promotor	Laborinterne Nummer
2-1-36 (BvSmp)	2354
2-1-47 (BvHis1-r)	2463
2-1-48 (BvMII)	2320
2-1-88 (BvTlp1)	2469
LWF05 (BvTlp2)	2565

2.4 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

Bezeichnung	Genotyp	Referenz	Kultivierung
<i>Escherichia coli</i>			
XL1-Blue MRF	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46</i> <i>thi relA1 lac F' [proAB⁺ lacI^f lacZΔ</i> <i>M15 Tn 10(tetr^r)]</i>	Stratgene	LB, 37°C
M15[pREP4]	<i>nal^S str^S rif^S thi lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtl⁻ F⁻</i> <i>recA⁺ uvr⁺ lon⁺ kan^r lacI^h</i>	Qiagen	LB, 37°C +kan
INVαF ⁻	<i>F' endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺)</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80 lacZΔ</i> M15 Δ (lacZYA ⁻ argF) U169 λ	Invitrogen	LB, 37°C

Fortsetzung

Bezeichnung	Referenz	Kultivierung
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
C58C1[pGV2260]	Chilton <i>et al.</i> (1984); Deblaere <i>et al.</i> (1985)	LB, 28°C +rif +carb

2.5 Pflanzenlinien

Folgende Pflanzenlinien wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Arabidopsis thaliana, Ökotyp Columbia (Col-0)

Nicotiana tabacum, Petit Havanna SR1

Arabidopsis thaliana, Ökotyp Columbia (Col-0), T-DNA-Insertionslinie SALK_128430

Arabidopsis thaliana, Ökotyp Columbia (Col-0), T-DNA-Insertionslinie SALK_021410

Beta vulgaris L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*, Linie 8T_0015

Die Salk-T-DNA-Insertionslinien wurden über das Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC) bezogen (Alonso *et al.*, 2003).

2.6 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die Tabellen 1 bis 6 listen die verwendeten Oligonukleotide gegliedert nach Versuch auf.

Tab. 1: Primer für die Herstellung der Promotor- β -Glucuronidasekonstrukte für die potentiell wurzelspezifischen Promotoren der Zuckerrübe, einschließlich ihrer Bezeichnung und ihrer Sequenz (vergl. Kap. 2.8.1).

Promotor	Primernamen	Primersequenz
2-1-36 BvSmp	2-1-36-P1	5' gca gaa ttc TCC CTA TTT AAA TCC ACT AAC TTC ATA GAC
	2-1-36-P2	5' gca tcc atg gGT GAA ACT ATC TCT ATA TCT CTT TCT C
2-1-47 BvHis1-r	2-1-47-P1	5' gca gaa ttc GGT CAG ATC GAT CTC CAC GTG TAC AT
	2-1-47-P2	5' gca tcc atg gCA CTG GAA ATT TTC TCT CTC TTC GTG 3'
2-1-48 BvMII	2-1-48-P1	5' gca gaa ttc GTT TGT TAA CTG AAC TGA ACT GTT AAT T
	2-1-48-P2	5' gca tcc atg gCT TTT GAA AAT TTT GAA ACG CTC AC
2-1-88 BvTlp1	2-1-88-P3	5' ctg gaa ttc G TGC ATG CGC ATT GGC CAT TGG AGT A
	2-1-88-P1	5' gca tcc atg gCT TGG AAG TTT GAG TAT TTT TTG G

Tab. 2: Primer für die Herstellung von „intron containing hairpin“-RNA-Konstrukten für das Silencen der H1-Varianten aus *Arabidopsis thaliana*, einschließlich ihrer Bezeichnung und ihrer Sequenz (vergl. Kap. 2.8.3).

IhpRNA Konstrukt	Primer-name	Primersequenz
His1-1	His1-R	5' AGGATCCGAATTCAACAGCTTTCTTAGCCGGAGATGTAAC 3'
	His1-L	5' AATCTAGACTCGAGCTAAGAAAACAATCGCCGTTAAACCTAA 3'
His1-2	His2-R	5' AGGATCCGAATTCTTCTTAGCCTTCCTAGTGAAGCTCTCT 3'
	His2-L	5' AATCTAGACTCGAGGTTTCCAAGACTAAAGCTGTTGCTGCTA 3'
His1-3	His3-R	5' AGGATCCGAATTCCCAAAACAAAGTCATCATCCATTTACAG 3'
	His3-L	5' AATCTAGACTCGAGTCTGTGAACAAACAAGAAAAGAAGAGGA 3'
Intron	Intron-L	5'-AAGGATCCGAGTACATGGTTAGTGTTCTTCCTTGG-3'
	Intron-R	5'-AAGAATTCGTACTTGAACATGTAGGTCTGCAGCAA-3'

Tab. 3: Primer für die Herstellung der Promotor-GUS-Konstrukte für die Promotoren der H1-Varianten aus *Arabidopsis thaliana* mit Bezeichnung und Sequenz (vergl. Kap. 2.8.4).

Promotor	Primernamen	Primersequenz
His1-1	LH1-Prom-Right	5' ATCCCCGGGCTGAACCTAAGATCGGAAAATTTGATTGC
	LH1-Prom-Left	5' ATCAAGCTTTTCAAGAATTACTGTTCAAGTGTGACTG
His1-2	LH2-Prom-Right	5' ATCCCCGGGTGATCTCTCTGTATTGATCGGAAGAAAATG
	LH2-Prom-Left	5' ATCTCTAGACAACGTTGCTTCGTTGGAGAACTACAGT
His1-3	LH3-Prom-Right	5' ATCCCCGGGGAAAGTGTTGCTTTGCTTGCTGTCTCT
	LH3-Prom-Left	5'-ATCAAGCTTGTCACATCATTAAGAGAACAGCTTGACC-

Tab. 4: Primer für die Überexpression der H1-Varianten von *Arabidopsis thaliana* in *E.coli*, einschließlich ihrer Bezeichnung und ihrer Sequenz (vergl. Kap. 2.8.5).

Protein	Primernamen	Primersequenz
His1-1	cDNA-His1-1-Rechts	5'-ACGAGCTCCGTTAACCATTCTTCTACCTACAAACCCTA-3'
	cDNA-His1-1-Links	5'-ACGGATCCCAGAAGACGATGTCAGAGGTGGAAATAG-3'
His1-2	cDNA-His1-2-Rechts	5'-ACGAGCTCTCTTCACTTCTTAGCCTTCCTAGTCGAA-3'
	cDNA-His1-2-Links	5'-ACGGATCCGATCAGTTTCTGAGAGAGAAGAAGATGTCT-3'
His1-3	cDNA-His1-3-Rechts	5'-ACGAGCTCCTTCTTCTCCTCCTCCTCAGTGATCAAG-3'
	cDNA-His1-3-Links	5'-ACGGATCCTTCACTAATCCTCTAATGGCAGAAGACA-3'

Tab. 5: Primer für die semiquantitative RT-PCR-Analyse zur Quantifizierung von Transkriptmengen der angegebenen mRNAs von *Arabidopsis thaliana*, einschließlich ihrer Bezeichnung und Sequenz (vergl. Kap. 2.10.1).

Quantifizierung Von	Primernamen	Primersequenz
His1-1	Kontrolle_A_Right	5'-CTCCTTACGCTTCTCCTCGATGAACT-3'
	Kontrolle_A_Left	5'-CGAAAGGACGAAAGACGAAGAATGTT-3'
His1-2	Kontrolle_B_Right	5'-TCCTCTATGAATTTCTGAATCGCGTA-3'
	Kontrolle_B_Left	5'-CGGCGAAAGGTGGTAAATCTAAGAAG-3'
His1-3	Kontrolle_C_Right	5'-GAAAACCACCACTCATCCTCCATACT-3'
	Kontrolle_C_Left	5'-GAAAACCACCACTCATCCTCCATACT-3'
GapC	GapC-L	5'-CTGACAGTAAGGTCAACAACTGAGA-3'
	GapC-R	5'-GGAATTGTTGAGGCTCTTATGACTA-3'

Tab. 6: Primer für die Identifizierung von homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten, einschließlich ihrer Bezeichnung und Sequenz (vergl. Kap. 2.12.1.3).

Knock-out	Primernamen	Primersequenz
His1-1	SALK_128430-1A-L	5'-CTCCTTACGCTTCTCCTCGATGAACTT-3'
	SALK_128430-1A-R	5'-TCATCGAAATTCTCTTTAGCATTATTGCG-3'
	T-DNA-pROK2-LB-P	5'-ACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAG-3'

Für den Nachweis von siRNAs mittels Northern-Blot-Hybridisierung wurde das Oligonukleotid mit der Bezeichnung „His1-1smallRNA-Sonde“ und der Sequenz 5' AGAAAACAATCGCCG TTAAACCTAA 3' eingesetzt (Kap. 2.10.5).

2.7 Antikörper und Peptide

Zum Nachweis der drei Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* mittels Western-Blot-Analyse wurden für jede Variante polyklonale Antikörper bei der Firma SeqLab (Göttingen) hergestellt. Es wurde je Variante ein spezifisches Peptid synthetisiert und über einen Cysteinrest mit dem Glycoprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt. Die Auswahl der Sequenzen der Peptide für die Immunisierung erfolgte nach den Kriterien, dass die gegen die Peptide gebildeten Antikörper nur für eine Linker-Histon-Variante spezifisch sind, und dass die Peptide in der Nähe des C-Terminus der Proteine liegen. Folgende Peptide wurden für die Herstellung von Antikörpern gegen die drei Linker-Histon-Varianten bei SeqLab synthetisiert:

Peptid	Sequenz
His1-1-Peptid	CTKKKTPVKKVVKPKT
His1-2-Peptid	CAKASRTS TRTSPGKK
His1-3-Peptid	CNKQEKK RKVKKARQPK

Die synthetisierten Peptide wurden für die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen eingesetzt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte nach dem Standard-Immunisierungsprotokoll der Firma SeqLab (3 Monate, Protokoll auf www.seqlab.de). Das gelieferte Serum (ca. 90 ml) wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.8 Konstrukte

2.8.1 Promotor- β -Glucuronidase-Reportergenkonstrukte für die Expressionsanalyse der Zuckerrübenpromotoren in Tabak

Für eine Expressionsanalyse von fünf potentiell wurzelspezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe (siehe Einleitung) im heterologen System wurden die Promotoren mit der β -Glucuronidase aus *E. coli* fusioniert und in Tabak transformiert.

Zunächst wurden die putativen Promotorregionen vor das promotorlose β -Glucuronidasegen in den Vektor pGUS3 (Köhler et al., 1995) kloniert. Anschließend erfolgte eine Umklonierung der Promotor-Reportergenkonstrukte in den binären Transformationsvektor pOCA28 (Honma et al., 1993; Olszewski et al., 1988). Die hergestellten Konstrukte wurden in Tabak transformiert (Hehl und Baker, 1989; Horsch et al., 1985).

Für die Reportergenkonstrukte wurden Promotorfragmente mit einer Größe von ungefähr 2 kb kloniert (die Zahlenangaben in diesem Kapitel beziehen sich jeweils auf den Translationsstart). Für die Klonierung der Promotoren von 2-1-36, 2-1-47, und 2-1-88 in pGUS3 wurde zunächst jeweils ein kleiner Bereich (bis 350 bp) 5' des Translationsstarts ATG mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide jeweils so gewählt, dass das resultierende PCR-Produkt am 5' Ende über eine EcoRI-Schnittstelle verfügt und am 3' Ende (am Translationsstartpunkt) über eine NcoI-Schnittstelle. In Tab. 1 finden sich Angaben über die Bezeichnungen und die Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide. Als Template für die PCRs wurde Plasmid-DNA eingesetzt, die die jeweilige Promotorregion enthielt (Kap. 2.3).

Die Amplifikation der gewünschten Fragmente erfolgte nach dem folgenden Protokoll.

1 μl	Template (100 pg)
2 μl	10x Advantage-II-Puffer (Clontech)
1 μl	Primergemisch (Primer 5' und 3', 50 pmol/ μl)
1 μl	dNTPs (10 mM)
0,5 μl	Advantage-II-Polymerasen-Mix (5 u/ μl , Clontech)
14,5 μl	ddH ₂ O
5 Minuten	94 $^{\circ}\text{C}$
30 Sekunden	94 $^{\circ}\text{C}$
30 Sekunden	53 $^{\circ}\text{C}$
150 Sekunden	70 $^{\circ}\text{C}$
5 min	70 $^{\circ}\text{C}$

} 30 Zyklen

Die amplifizierten Fragmente wurden direktionell als EcoRI/NcoI Fragmente in pGUS3 kloniert. Am Translationsstartpunkt des GUS-Gens im Vektor befindet sich eine NcoI-Schnittstelle (ccATGg), 5' im Polylinker eine EcoRI-Schnittstelle. Nach der Klonierung wurden die Sequenzen der einzelnen Promotorfragmente durch eine Sequenzanalyse verifiziert. Der Primer am 5' Ende des Fragmentes wurde so gewählt, dass seine Sequenz eine Restriktionsschnittstelle des Promotors enthält (für 2-1-36 SmaI, für 2-1-47 Eco72I, für 2-1-88 PaeI). Über diese Restriktionsschnittstellen wurde jeweils der restliche Teil der putativen Promotorregion in den Vektor kloniert. Die Klonierung in zwei Schritten wurde gewählt, um eventuelle, durch die PCR verursachte Sequenzveränderungen zu minimieren. Für die Subklonierung des restlichen Promotorfragmentes von 2-1-36 wurde das Derivat von pBSK+, in dem der Promotorbereich von 2-1-36 vorlag (Kap. 2.3), zunächst mit BamHI gespalten. Nach einem Fill-in der überhängenden Enden wurde über eine Restriktionsspaltung mit SmaI (generiert glatte Enden) das zweite Promotorfragment vollständig ausgeschnitten. Anschließend wurde es in den mit SmaI geschnittenen pGUS3-Vektor mit dem kleinen Promotorfragment von 2-1-36 kloniert. Über diagnostische Testspaltungen wurde überprüft, ob das zweite Promotorfragment in der richtigen Orientierung subkloniert worden war.

Für die Subklonierung des zweiten Promotorfragmentes von 2-1-47 wurde der pGUS3 Vektor mit dem kleinen Promotorfragment von 2-1-47 mit Eco72I (schafft glatte Enden) geschnitten. Daraufhin wurde in diesen Vektor das zweite Promotorfragment ligiert, das mit Eco72I und HincII aus dem pBSK+ Derivat mit dem Promotorbereich von 2-1-47 ausgeschnitten worden war. Auch hier wurde über diagnostische Testspaltungen die Orientierung des subklonierten Fragments überprüft.

Zur Subklonierung des zweiten Promotorfragmentes von 2-1-88 wurde dieses Fragment aus dem pBSK+ Vektor, in dem der Promotorbereich von 2-1-88 vorlag (Kap. 2.3), mit HindIII und PaeI ausgeschnitten und über diese Schnittstellen in den pGUS3 Vektor mit dem PCR-Fragment von 2-1-88 kloniert.

Tab. 7 gibt die Bezeichnungen der hergestellten Promotor-Reportergenkonstrukte wieder.

Im Falle der Klonierung des Promotors von 2-1-48 konnte in der Promotorsequenz keine geeignete zusätzliche Restriktionsschnittstelle gefunden werden, die eine Vorgehensweise wie für die anderen Promotoren ermöglichte. Deshalb wurde durch eine PCR das gesamte zu untersuchende Promotorfragment amplifiziert. Wie bei den übrigen Promotorfragmenten auch, wurde durch die PCR eine NcoI-Schnittstelle bzw. eine EcoRI-Schnittstelle geschaffen. Über diese Schnittstellen erfolgte die Klonierung in pGUS3 (Größe 1722 bp, Tab. 7) .

Am Startcodon von LWF05 befindet sich eine PaeI-Schnittstelle. PaeI schafft die gleichen überhängenden Enden wie NcoI. Deshalb wurde das Promotorfragment von LWF05 direkt

über eine PvuII/PagI Spaltung in den mit SmaI/NcoI gespaltenen Vektor pGUS3 kloniert (Größe 1951 bp).

Die fünf Promotor-Reportergenkonstrukte wurden danach in den Vektor pOCA28 umklont. Mit Ausnahme von 2-1-47 und LWF05 wurden alle Konstrukte mit PvuII aus pGUS3 ausgeschnitten und in den Polylinker des mit SmaI gespaltenen Vektors pOCA28 kloniert. Die Promotor-Reportergenkonstrukte von LWF05 bzw. 2-1-47 wurden über eine HindIII/SacI Spaltung in pOCA28(HindIII/SacI) ligiert. In der Promotorsequenz von LWF05 befindet sich eine HindIII-Schnittstelle, daher verkleinert sich der klonierte Promotorbereich um 372 bp auf 1579 bp. Für alle pOCA28-Konstrukte wurde mittels Southern-Blot-Analysen überprüft, ob sie das richtige Insert enthalten.

Über Elektroporation wurden die pOCA28 Konstrukte in den Agrobakterienstamm C58C1 mit dem residenten Plasmid pGV2260 transformiert (Kap. 2.10.2). Die Tabaktransformation erfolgte mittels der Blattscheiben-Transformationsmethode (Kap. 2.12.2.2).

Tab. 7: Bezeichnungen und Größe der hergestellten Promotor-GUS-Konstrukte.

Promotor	Bezeichnung pGUS3-Konstrukt	Bezeichnung pOCA28-Konstrukt	Größe des subklonierten Fragmentes
2-1-36, BvSmp	36G-pGUS3	36-GUS-pOCA28	1841 bp
2-1-47, BvHis1-r	47G-pGUS3	47-GUS-pOCA28	1668 bp
2-1-48, BvMII	48G-pGUS3	48-GUS-pOCA28	1722 bp
2-1-88, BvTlp1	88G-pGUS3	88-GUS-pOCA28	2502 bp
LWF05, BvTlp2	LWFG-pGUS3	LWF05-GUS-pOCA28	1579 bp

2.8.2 Promotor-Luciferase Reportergenkonstrukte für stabile Expressionsanalysen in der Zuckerrübe

Für eine Expressionsanalyse der fünf potentiell wurzelspezifischen Promotoren der Zuckerrübe im homologen System wurden die Promotoren mit der Luciferase aus *Photinus pyralis* (LUC) fusioniert. Die β -Glucuronidase aus *E. coli* eignet sich nicht gut für Expressionsanalysen in der Zuckerrübe, da phenolische Verbindungen die β -Glucuronidase inhibieren (Vainstain *et al.*, 1993). Diese Verbindungen sind auch in der Wurzel der Zuckerrübe vorhanden.

Für die Fusionierung der einzelnen Promotoren mit dem LUC-Gen wurde das GUS-Gen aus den in Kap. 2.8.1 beschriebenen Promotor-GUS-Konstrukten gegen das LUC-Gen aus dem Vektor JE3-pBT-35S-Luc-m3 ausgetauscht. Anschließend erfolgte eine Umklonierung der Promotor-LUC-Konstrukte in den binären Transformationsvektor pGPTV-Bar.

Zur Herstellung der Promotor-LUC-Reportergenkonstrukte von 2-1-36, -47 und -48 wurde durch eine NcoI/BamHI-Doppelspaltung das β -Glucuronidasegen aus den Promotor-GUS

Konstrukten von 36G-, 47G-, 48G-pGUS3 (Tab. 7) entfernt. Anschließend erfolgte eine direktionelle Klonierung des NcoI/BglII-Luciferase/nos poly A-Fragmentes aus JE3-pBT-35S-Luc-m3 in die entstandene NcoI/BamHI-Schnittstelle. Diese Klonierung war möglich, da sowohl das eingesetzte GUS-Gen aus *E. coli* als auch das LUC-Gen aus *P. pyralis* am Translationsstartpunkt über eine NcoI-Schnittstelle (ccATGg) verfügen. Außerdem schaffen BamHI und BglII die gleichen überhängenden Enden. Da der Promotor von 2-1-88 zwei BamHI-Schnittstellen enthält, konnte das GUS-Gen aus 88G-pGUS3 (Tab. 7) nicht über eine BamHI/NcoI-Doppelspaltung entfernt werden, ohne gleichzeitig das Promotorfragment zu spalten. Zur Entfernung des GUS-Gens wurde deshalb zunächst mit dem Restriktionsenzym SacI gespalten. SacI schneidet 3' von der Sequenz für das Polyadenylierungs-Signal. Mit der T4 DNA Polymerase wurden daraufhin die überhängenden SacI-Enden aufgefüllt, danach wurde das GUS-Gen mit NcoI vollständig ausgeschnitten. In die entstandenen Schnittstellen wurde anschließend das Luciferase-Gen aus JE3-pBT-35S-Luc-m3 (BglII fill-in, NcoI) direktionell eingefügt.

Für die Klonierung des Promotors von LWF05 konnte die oben beschriebene Vorgehensweise, der Austausch des GUS-Gens durch das LUC-Gen, nicht durchgeführt werden, da die NcoI-Schnittstelle am Startcodon des GUS-Reportergens nicht mehr existierte (vergl. Kap. 2.8.1). Deshalb wurde aus dem Promotor-LUC-Konstrukt von 2-1-36 über eine NcoI/HindIII-Doppelspaltung der Promotor von 2-1-36 entfernt und in die entstandene NcoI/HindIII-Schnittstelle das Pgl/HindIII-Promotorfragment von LWF05 kloniert (NcoI und Pgl schaffen die gleichen überhängenden Enden).

Die erhaltenen fünf Promotor-LUC-Reportergenkonstrukte wurden in den binären T-DNA Vektor pGPTV-Bar umklont. Dazu wurden die Promotor-LUC-Fragmente von 2-1-36, 48, 88 sowie von LWF05 mit PvuII und HindIII ausgeschnitten und in die HindIII/SmaI Schnittstelle von pGPTV-Bar kloniert. Das Promotor-LUC-Fragment von 2-1-47 wurde mit HindIII und FspI ausgeschnitten und ebenfalls in die HindIII/SmaI-Schnittstelle von pGPTV-Bar kloniert. Tab. 8 enthält eine Übersicht über die hergestellten Promotor-LUC-Konstrukte einschließlich ihrer Bezeichnungen. Die beschriebenen T-DNA-Konstrukte wurden von der Planta GmbH (Einbeck) über eine Agrobakterien vermittelte Transformation stabil in die Zuckerrübe transformiert.

Tab. 8: Bezeichnungen der Promotor-LUC-Konstrukte für Expressionsanalysen in der Zuckerrübe

Promotor	Bezeichnungen LUC-Konstrukte
2-1-36, BvSmp	36-LUC-pGPTV-Bar
2-1-47, BvHis1-r	47-LUC-pGPTV-Bar
2-1-48, BvMII	48-LUC-pGPTV-Bar
2-1-88, BvTlp1	88-LUC-pGPTV-Bar
LWF05, BvTlp2	LWF05-LUC-pGPTV-Bar

2.8.3 PTGS-Konstrukte für das Silencing von Linker-Histon-Varianten in *Arabidopsis thaliana*

Für das Silencing der drei Linker-Histon-Varianten His1-1, His1-2 und His1-3 von *Arabidopsis thaliana* durch PTGS (bzw. RNAi) wurden ihp-Konstrukte (intron containing haipin) erstellt, die für doppelsträngige RNA kodieren. Ihp-Konstrukte silencen effizient ihr Zielgen (Varsha-Wesley *et al.*, 2001). Sie enthalten zwischen einem Sense- und einem dazu komplementären Antisense-Bereich, der zu dem jeweiligen Zielgen homolog ist, ein funktionelles Intron. Die einzelnen ihp-Konstrukte gegen His1-1, His1-2 und His1-3 wurden in T-DNA-Vektoren mit unterschiedlichen pflanzlichen Selektionsmarkern kloniert, um später Kreuzungsprodukte zwischen His1-1-, His1-2- und His1-3-Knock-down-Pflanzen einfacher selektieren zu können. Abb. 2 enthält eine schematische Darstellung über die Herstellung der ihp-Konstrukte. Für die Auswahl der Primer zur Herstellung der ihp-Konstrukte wurden die für *Arabidopsis thaliana* annotierten Sequenzen eingesetzt (www.arabidopsis.org).

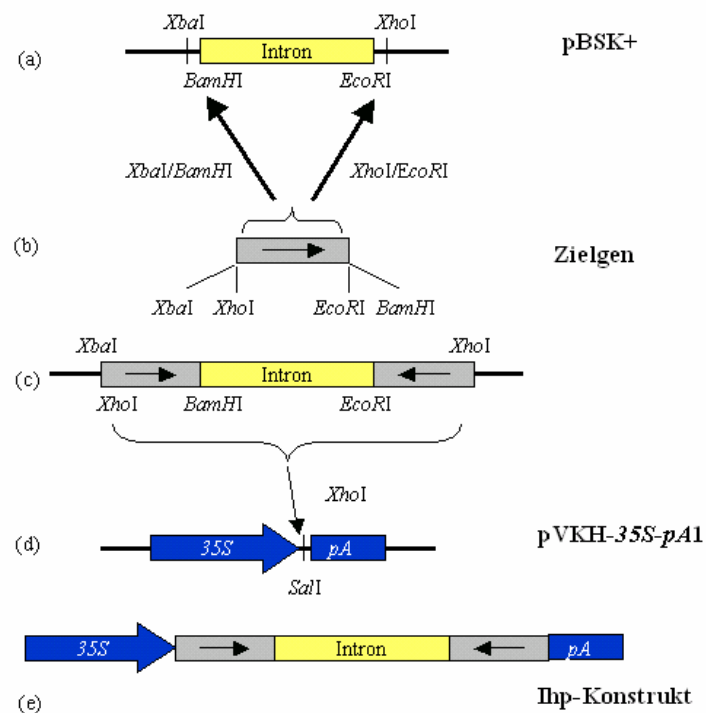


Abb. 2: Schematische Darstellung der Herstellung eines für doppelsträngige RNA kodierenden ihp-Konstruktes. Ein funktionelles Intron wurde mittels PCR amplifiziert und in pBSK+ kloniert (a). 5' bzw. 3' zum Intron wurde ein Sequenzbereich des Zielgens in Sense- bzw. Antisenseorientierung kloniert (b)+(c). Es folgte die Umklonierung des Konstruktes hinter den CaMV 35S-Promotor des binären Transformationsvektors pVKH-35S-pA1 (d)+(e).

Für die Herstellung der ihp-Konstrukte wurde zunächst unter Verwendung der Oligonukleotide mit den Bezeichnungen Intron-L und Intron-R (vergl. Tab. 2) ein vollständiges, funktionelles Intron von At3g04120 mittels PCR amplifiziert. Als Template wurde genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia (Col-0), eingesetzt. Die

Oligonukleotide fügen an das 5' bzw. an das 3' Ende des amplifizierten Produktes eine BamHI bzw. EcoRI-Schnittstelle ein. Diese Schnittstellen wurden für die Klonierung in den mit BamHI und EcoRI geschnittenen Vektor pBSK+ (Stratagene) eingesetzt. Durch eine Sequenzierung wurde die Sequenz des subklonierten Introns verifiziert. Danach wurde 5' vor das Intron ein ca. 200 bp großes Fragment des jeweiligen Zielgens in Sense-Orientierung und 3' hinter das Intron das gleiche Fragment in Antisense-Orientierung kloniert. Um diese Klonierungen zu ermöglichen, wurden die eingesetzten Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen, so dass die PCR-Produkte am 5' Ende jeweils eine XbaI- und XhoI-Schnittstelle und am 3' Ende eine EcoRI- und BamHI-Schnittstelle hatten (Tab. 2). Die amplifizierten Bereiche der einzelnen Gene wurden so gewählt, dass die Homologien untereinander möglichst gering waren, so dass die hergestellten Konstrukte spezifisch ihr Zielgen silencen und nicht die anderen Linker-Histon-Varianten. Der amplifizierte Bereich von His1-1 hat eine Größe von 202 bp, der von His1-2 eine von 200 bp, und der von His1-3 eine von 203 bp.

Die hergestellten PCR-Produkte wurden nach Anhängen eines Adenosins über eine T/A-Klonierung in den Vektor pCR2.1 kloniert. Die in pCR2.1 subklonierten Fragmente wurden 3' hinter das Intron über EcoRI/XhoI in Antisense-Orientierung kloniert, daraufhin erfolgte die Klonierung in Sense-Orientierung über XbaI/BamHI. Die hergestellten Sense-Intron-Antisense-Konstrukte wurden anschließend mit XhoI ausgeschnitten und in den mit Sall geschnittenen binären Transformationsvektor pVKH-35S-pA1 zwischen den 35S-Promotor und die Polyadenylierungssequenz kloniert. Dies war möglich, da Sall und XhoI die gleichen überhängenden Enden schaffen. Durch diagnostische Testspaltungen wurde überprüft, ob die Konstrukte direktionell vorlagen wie folgt: 35S-Sense-Intron-Antisense-pA (Abb. 2). Die T-DNA des Vektors pVKH-35S-pA1 vermittelt in Pflanzen eine Resistenz gegen Hygromycin B. Um die Kreuzungsprodukte aus den einzelnen Single-Knock-downs einfacher selektieren zu können, wurden die ihp-Konstrukte für His1-1 und His1-2 in T-DNA-Vektoren mit anderen Selektionsmarkern umklont. Das ihp-Konstrukt für His1-1 in den binären Transformationsvektor pART27 ligiert, dessen T-DNA *in planta* eine Resistenz gegen Kanamycin bewirkt. Dazu wurde das ihp-Konstrukt mit SacI (Schnittstelle 5' vom 35S-Promotor) und ApaI aus pVKH-35S-pA1 ausgeschnitten in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pART27 kloniert. Das ihp-Konstrukt für His1-2 wurde in pGPTV-Bar ligiert. Dazu wurde es über SacI, fill-in/ApaI, fill-in in den mit SmaI geschnittenen Vektor T-DNA-Vektor eingebracht. Dieser Vektor vermittelt in Pflanzen eine Resistenz gegen Phosphinothricin. Tab. 9 enthält eine Übersicht über die hergestellten Konstrukte, über die eingesetzten T-DNA-Vektoren sowie über die pflanzlichen Selektionsmarker der einzelnen T-DNA-Vektoren.

Über Elektroporation wurden die hergestellten T-DNA-Konstrukte in den Agrobakterienstamm C58C1 mit dem residenten Plasmid pGV2260 transformiert

(Kap. 2.10.2). Daraufhin erfolgte die stabile Transformation in *Arabidopsis thaliana* mittels Floral-Dip (Kap. 2.12.1.2).

Tab. 9: Angaben über die Bezeichnungen der hergestellten ihp-Konstrukte, über die für die Herstellung der Konstrukte eingesetzten T-DNA-Vektoren sowie über die pflanzlichen Selektionsmarker der T-DNAs.

Ihp-Konstrukt für	T-DNA-Vektor	Selektion <i>in planta</i> über	Bezeichnung
AtHis1-1, At1g06760	pART27	Kanamycin	His1-1-ihp
AtHis1-2, At2g30620	pGPTV-Bar	Phosphinothricin	His1-2-ihp
AtHis1-3, At2g18050	pVKH-35S-pA	Hygromycin	His1-3-ihp

2.8.4 Promotor-Reportergenkonstrukte für die Linker-Histon-Promotoren aus *Arabidopsis thaliana* mit der β -Glucuronidase (GUS) aus *E. coli*

Für die Expressionsanalyse der Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana* wurden die Promotoren von His1-1, His1-2 und His1-3 mit der β -Glucuronidase (GUS) aus *E. coli* fusioniert und *in planta* transformiert.

Die Promotor-Reportergenkonstrukte wurden in den zuvor modifizierten binären T-DNA-Vektor pVKI-GAL4.r (Kap. 2.3) kloniert. Die T-DNA dieses Vektors vermittelt *in planta* eine Resistenz gegen Methotrexat. Dies ermöglicht eine leichtere Selektion der Kreuzungsprodukte aus Linker-Histon Knock-down-Pflanzen (resistent gegen Kanamycin, Phosphinothricin und Hygromycin B) und Linker-Histon Promotor-GUS-Pflanzen.

Zur Herstellung der Promotor-Reportergenkonstrukte wurde zunächst die 35S-LacI-Gal4-pA-Kassette aus dem binären T-DNA-Vektor pVKI-GAL4.r durch eine PstI-Spaltung und einer sich darauf anschließenden Religation des Vektors entfernt. Über SmaI/EcoRI wurde das GUS-Gen aus pGPTV-Bar in den durch die Entfernung der 35S-LacI-Gal4-pA-Kassette modifizierten Vektor kloniert. Die Promotorregionen von His1-1, His1-2 und His1-3 wurden mittels PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 kloniert. Die Oligonukleotide für die Amplifikation der Promotorregionen fügten an das 5' Ende der PCR-Produkte eine HindIII-Schnittstelle an, und an das 3' Ende eine SmaI-Schnittstelle (Tab. 3). Über diese Schnittstellen wurden die Promotorfragmente aus pCR2.1 ausgeschnitten und direktionell vor das GUS-Gen des modifizierten T-DNA-Vektors kloniert. Die beschriebenen Promotor-Reportergenkonstrukte wurden von René Pietsch im Rahmen einer Studienarbeit erstellt. Eine Übersicht über die hergestellten Konstrukte sowie ihre Bezeichnungen befindet sich im Tab. 10.

Die T-DNA-Konstrukte wurden in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58C1 mit dem residenten Plasmid pGV2260 transformiert (Kap. 2.10.2). Daraufhin erfolgte die stabile Transformation der Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* mittels Floral-Dip (Kap. 2.12.1.2).

Tab. 10: Bezeichnung der Promotor-GUS Konstrukte für die Linker-Histon-Promotoren von *Arabidopsis thaliana*.

Promotor von	Bezeichnung
AtHis1-1	His1-1Prom-pVK-GUS3
AtHis1-2	His1-2Prom-pVK-GUS3
AtHis1-3	His1-3Prom-pVK-GUS3

2.8.5 Konstrukte für die Expression der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* in *E. coli*

Für die Überexpression von rekombinanten Linker-Histon-Varianten aus *A. thaliana* in *E. coli* wurden die kodierenden Bereiche der jeweiligen Gene in den Expressionsvektor pQE30 von Qiagen kloniert. Dieser Vektor enthält im Polylinker die Sequenz für einen 6xHis-Tag, über den die überexprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie spezifisch aufgereinigt werden können. Die kodierenden Bereiche der drei Linker-Histon-Varianten wurden mittels PCR amplifiziert. Als Template diente Erststrang-cDNA aus dem Wildtyp (Kap. 2.10.1). Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 4 aufgeführt. Sie fügen an das 5' bzw. an das 3' Ende des PCR-Produktes eine BamHI- bzw. SacI-Restriktionsschnittstelle ein.

Die PCRs wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

0,25 µl	Template (ca. 1 ng)
2 µl	10x Advantage-II-Puffer (Clontech)
1 µl	Primergemisch (Primer „Rechts“ und „Links“, je 50 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	Advantage-II-Polymerasen-Mix (5 u/µl, Clontech)
15,25 µl	ddH ₂ O
5 Minuten	94°C
30 Sekunden	94°C
30 Sekunden	63°C
90 Sekunden	70°C
5 min	70°C

} 36 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden zunächst nach Anhängen eines Adenosins über eine T/A-Klonierung in den Vektor pCR2.1 kloniert. Über eine Sequenzierung wurden die amplifizierten Sequenzbereiche verifiziert. Anschließend wurden die subklonierten PCR-Produkte über die durch die PCR angehängten Restriktionsschnittstellen direktionell in den mit BamHI und SacI geschnittenen Expressionsvektor pQE30 ligiert und in den *E. coli* Stamm M15[pREP4] transformiert (Kap. 2.3 und Kap. 2.4). Für die Transformation der Konstrukte wurden die Angaben aus dem Begleitheft „The QIAexpressionist“ von Qiagen befolgt. Tab. 11 enthält eine Übersicht über die hergestellten Konstrukte und ihre Bezeichnung.

Tab. 11: Bezeichnung der Konstrukte für die Überexpression der Linker-Histon-Varianten von *A. thaliana* in *E. coli*.

Überexpression von	Bezeichnung
AtHis1-1	His1-1pQE30
AtHis1-2	His1-2pQE30
AtHis1-3	His1-3-pQE30

2.9 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder nach den Angaben der Hersteller der eingesetzten Kits oder der Enzyme durchgeführt. Zu diesen Methoden gehören das Fällern von Nukleinsäuren, das Arbeiten mit Restriktionsendonukleasen und weiteren DNA-modifizierenden Enzymen wie der T4-DNA-Ligase oder der alkalischen Phosphatase. Weiterhin zählen zu diesen Methoden die Kultivierung von *E. coli*, die Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen in *E. coli*, die Herstellung von kompetenten Zellen, die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, das Auftrennen von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese und die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel. Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977) oder als Auftragsarbeit von Dienstleistungsfirmen durchgeführt (Seqlab, Göttingen; Amodia, Braunschweig). Radioaktive Endmarkierungen von DNA-Oligonukleotiden wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) vorgenommen.

2.10 Spezielle molekularbiologische Methoden

2.10.1 Semiquantitative RT-PCR

Semiquantitative RT-PCR-Analysen wurden durchgeführt, um die Transkriptmengen der drei Linker-Histone in Linker-Histon Single-, Double-, und Triple-Knock-down-Linien von *Arabidopsis thaliana* zu quantifizieren. Zur Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen GapC aus *Arabidopsis thaliana* amplifiziert.

Gesamt-RNA wurde mit dem NucleoSpin® RNA Plant Kit aus ca. 100 mg jungem Blattmaterial aufgereinigt. Ca. 0,5 µg der aufgereinigten RNA wurden als Template für eine Erststrang-cDNA-Synthese mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit eingesetzt. Eine 1:20 Verdünnung der Produkte der Erststrang-cDNA-Synthese diente als Template für die semiquantitative RT-PCR-Analyse. Die dafür eingesetzten Primer sind in Tab. 5 aufgeführt. Die PCRs wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

2,5 µl	Template	
3 µl	10x Puffer mit MgCl ₂ (Qbiogene)	
1 µl	Primergemisch (Primer „Rechts“ und „Links“, je 12 pmol/µl)	
0,5 µl	dNTPs (10 mM)	
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 u/µl, Qbiogene oder Invitrogen)	
22,8 µl	ddH ₂ O	
5 Minuten	94°C	} 25-32 Zyklen
30 Sekunden	94°C	
60 Sekunden	63°C	
60 Sekunden	72°C	
5 min	72°C	

Zur Quantifizierung der PCR-Amplifikate wurden jeweils 5 µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.10.2 Transformation von Plasmid-DNA in *Agrobacterium tumefaciens* mittels Elektroporation

Die Transformation von Derivaten binärer Transformationsvektoren in *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte mittels Elektroporation nach Nagel *et al.* (1990). Eingesetzt wurde der *A. tumefaciens* Stamm C58C1 mit dem residenten Plasmid pGV2260 (Kap. 2.4).

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 5 ml einer Übernachtskultur [in 50 µg/ml Rifampicin, 100 µg/ml Carbenicillin] dieses Stammes in 250 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert (ca. 6 h). Die Zellen wurden bei 4000g und 4°C für 10 min zentrifugiert, danach in 25 ml sterilfiltriertem, eiskaltem 1 mM HEPES pH 7,0 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, zuletzt wurde das Pellet in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die elektrokompenten Zellen wurden in Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurde die zu transformierende Plasmid-DNA zunächst durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und eine Ethanol-fällung entsalzt. 200 ng aufgereinigte Vektor-DNA, gelöst in 1 µl ddH₂O, wurden mit 50 µl elektrokompenter Zellen in einer Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, Peqlab, Best.-Nr. 712020) gemischt. Die Elektroporation wurde in einem Gene Pulse Controller von Bio-Rad bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität des Kondensators von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB aufgenommen und bei 28°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden 5 bzw. 50 µl des Transformationsansatzes auf LB-Medium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, ausplattiert.

2.10.3 Aufreinigung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* im kleinen Maßstab (modifiziert nach Li und Chory, 2001)

Zur Aufreinigung von kleinen, für Test-PCRs ausreichende Mengen an genomischer DNA wurden ca. 0,25 cm² Blattmaterial drei Wochen alter Pflanzen in einem Eppendorfgefäß mit einem Eppendormörser zerkleinert und mit 500 µl Extraktionspuffer versetzt [0,2 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS]. Der Ansatz wurde 2 min bei Raumtemperatur in einer Eppendortischzentrifuge auf höchster Stufe zentrifugiert. 350 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Präzipitation der DNA mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach 10 min Zentrifugation bei RT auf höchster Stufe wurde der Überstand verworfen, das Pellet trocknen gelassen und anschließend in 100 µl LTE gelöst. 2 µl der Lösung mit der genomischen DNA wurden als Template für Test-PCRs für die Identifizierung von für T-DNA-Insertionen homozygoten Pflanzen (Kap. 2.12.1.2), oder für den Nachweis, dass Pflanzen transgen sind, eingesetzt.

2.10.4 Aufreinigung von RNAs mit geringem Molekulargewicht (5S RNA, tRNAs, siRNAs) aus *Arabidopsis thaliana* nach Hamilton und Baulcombe (1999)

RNAs mit geringem Molekulargewicht („kleine RNAs“) wurden zum Nachweis von siRNAs durch Northern-Blot-Analysen aufgereinigt (vergl. Kap. 2.10.1).

Die für die Aufreinigung von kleinen RNAs eingesetzten wässrigen Lösungen wurden mit Ausnahme der Lösungen, die Tris-HCl enthielten, zur Inaktivierung von RNAsen mit 1/1000 Volumen DEPC versetzt und nach Inkubation über Nacht autoklaviert.

Für die Aufreinigung von kleinen RNAs wurden 1-2 g frisches Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in 5 Volumen Extraktionspuffer resuspendiert [50 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% (w/v) SDS]. Die Suspensionen wurden zweimal mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 v/v/v) extrahiert. Die Gesamt-Nukleinsäuren (RNA und DNA) wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen 98 % Ethanol für drei Stunden bei -20 °C präzipitiert. Anschließend wurden sie durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 20000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl ddH₂O gelöst. Durch Zugabe von 400 µl 1 M NaCl und 200 µl 20 % (w/v) PEG 8000 (Sigma) und einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden Nukleinsäuren mit hohem Molekulargewicht präzipitiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C wurden die im Überstand verbliebenen kleinen RNAs durch eine wie oben beschriebene Ethanol-fällung gefällt. Das Pellet wurde in 50 µl ddH₂O gelöst. Zur Konzentrationsabschätzung wurde ein Aliquot von 1 µl auf ein 1,5 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Die kleinen RNAs wurden bei -80 °C gelagert.

2.10.5 Northern-Blot-Analyse zum Nachweis von siRNAs

Zum Nachweis von siRNAs aus transgenen Pflanzen, die ihp-RNA-Konstrukte tragen, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Aus *Arabidopsis thaliana* aufgereinigte RNAs mit geringem Molekulargewicht (Kap. 2.10.4) wurden durch eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit einem radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid hybridisiert.

2.10.5.1 Auftrennung von kleinen RNAs durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von kleinen Nukleinsäuren erfolgte in Polyacrylamid-Harnstoffgelen. Zur Herstellung wurden 8,4 g Harnstoff in 11,3 ml 30 % Polyacrylamid [Rotiphorese®30-Gel (37,5:1) von Roth], 1 ml 10x TBE (Roth) und 1,3 ml ddH₂O durch Rühren und durch Erwärmen im 37°C-Bad gelöst. Durch Zugabe von 15 µl TEMED und 100 µl 10 % APS wurde die Polymerisation des Gels gestartet. Das Gel wurde zwischen zwei zusammengesetzte und abgedichtete Glasplatten gegossen. Anschließend erfolgte die Polymerisation des Gels (Dauer: ca. eine Stunde). Nach der Polymerisation wurde ein einstündiger Vorlauf des Gels bei einer Spannung von 180 V durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE (Roth) eingesetzt. Die RNA-Proben und der Größenstandard wurden mit 1,5 Volumen Ladepuffer versetzt [67 % (v/v) deionisiertes Formamid, 16,7 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 16,7 mM Tris-HCl pH 7,6, 1,7 mM EDTA] und für 4 Minuten bei 95°C denaturiert. Als Größenstandard wurden jeweils 300 pmol DNA-Oligonukleotide eingesetzt, die aus 19, 25 bzw. 35 Nukleotiden bestanden. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 180 V (Dauer ca. 40 Minuten). Nach dem Gellauf wurde das Gel zur Anfärbung der RNAs für 5 min in 100 ml 0,25x TBE, das mit 10 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/µl) versetzt war, geschwenkt. Anschließend wurde es kurz mit deionisiertem Wasser gespült und photographiert. Für den Transfer der Nukleinsäuren aus dem Gel auf eine Hybond-N-Nylonmembran (Amersham Biosciences) wurde der Semi-Dry-Blotter Pegasus (Phase GmbH) eingesetzt. Dazu wurden vier Whatman-Filterpapiere und die Nylonmembran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in 0,25x TBE getränkt. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut (von unten nach oben): Kathode, zwei Whatman-Filterpapiere, Gel, Nylonmembran, zwei Whatman-Filterpapiere, Anode. Der Transfer erfolgte bei 1,5 mA/cm² für 25 Minuten. Nach dem Transfer wurde die Membran beschriftet, mit der RNA-Seite nach unten auf eine Haushaltsfolie gelegt und zur Quervernetzung der RNA mit der Nylonmembran für drei Minuten auf einem Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt. Die Membranen konnten anschließend für Northern-Blot-Hybridisierungen zum Nachweis von siRNAs eingesetzt werden (Kap. 2.10.5.2).

2.10.5.2 Northern-Blot-Hybridisierung zum Nachweis von siRNAs

Als Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen zum Nachweis von siRNAs wurde ein am 5' Ende mit [^{32}P] γ -ATP markiertes, 25 bp langes DNA-Oligonukleotid eingesetzt (Kapitel 2.6). Zur Vorhybridisierung wurde die Nylonmembran für eine Stunde in Church-Puffer [0,25 M NaPO_4 -Puffer pH 7, 0,7 % (w/v) SDS, 50 $\mu\text{g/ml}$ Heringssperma-DNA] bei 37°C geschwenkt. Die Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Nylonmembran wurde nach der Hybridisierung dreimal fünf Minuten mit Waschlösung I [4x SSC, 0,1 % (w/v) SDS; (20x SSC: 2 M NaCl; 12 M NaOC_2H_5)] und zweimal eine Minute mit Waschlösung II [2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS] gewaschen. Die Exposition gegen einen HyperfilmTM MP-Röntgenfilm von Pharmacia Biotech erfolgte bei -80°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie.

2.11 Proteinbiochemische Techniken

2.11.1 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wässriger Proteinlösungen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976).

Ein Volumen Bradford-Reagenz (Roti[®]-Quant, Roth) wurde mit vier Volumen deionisiertem Wasser verdünnt. 5-10 μl der Proteinlösungen wurden mit 1 ml des verdünnten Bradford-Reagenz versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Reaktionsansätze wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Referenz dienten Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Rinder-Serum-Albumin.

2.11.2 Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität

2.11.2.1 Fluorometrische Bestimmung der quantitativen β -Glucuronidaseaktivität

Die Bestimmung der quantitativen β -Glucuronidaseaktivität erfolgte nach Jefferson *et al.* (1987a und b). Die β -Glucuronidase setzt das nicht fluoreszierende Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG) in das fluoreszierende Produkt 4-Methylumbelliferon (4-MU) um. Über die Stärke der Fluoreszenz lässt sich die Konzentration von 4-MU und somit die quantitative GUS-Aktivität berechnen.

Zur Bestimmung der quantitativen β -Glucuronidaseaktivität wurden 50-100 mg des zu untersuchenden Gewebes mit 250 μl GUS-Reaktionspuffer [50 mM NaPO_4 pH 7,0; 10 mM EDTA; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,1% (v/v) N-Laurylsarkosin; 10mM β -Mercaptoethanol] versetzt und mit Hilfe eines Eppendorfmörser aufgearbeitet. Die Proben wurden

anschließend 20 min in einer Eppendorftischzentrifuge auf höchster Stufe bei 4°C zentrifugiert. Für die Bestimmung der GUS-Aktivität wurden 20 µl des Überstandes eingesetzt. Diese wurden mit 180 µl GUS-Reaktionspuffer [1 mM 4-MUG; 50 mM NaPO₄ pH 7,0; 10 mM EDTA; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,1% (v/v) N-Laurylsarkosin; 10mM β-Mercaptoethanol] versetzt, der auf 37°C vortemperiert worden war. Sofort im Anschluss wurde dem Reaktionsansatz für den Nullwert ein 20 µl-Aliquot entnommen und in 980 µl Stopp-Puffer (0,2 M Na₂CO₃) überführt. Nach jeweils 10, 20 und 30 min erfolgten weitere Probenahmen. Die Bestimmung der Konzentration des gebildeten Produktes 4-Methylumbelliferon (4-MU) erfolgte über Fluoreszenzanregung in einem Spektralphotometer (Kontron Instruments SFM 25; Exzitation: 365 nm; Emission: 455 nm), dessen Messwerte in der Einheit FU/s ausgegeben wurden (FU: Fluoreszenzeinheiten). Über diese Werte wurde die GUS-Aktivität berechnet. Dazu wurden aus den gemessenen Werten nach 10, 20 und 30 min die Fluoreszenzeinheiten pro Minute bestimmt. 300 Fluoreszenzeinheiten entsprechen einer 4-MU-Konzentration von 10 nM. Durch die Division des berechneten Wertes mit dem Quotienten 30 wurde der Substratumsatz in „pmol 4-MU*min⁻¹*mg⁻¹ Protein“ berechnet. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach Bradford (Kap. 2.11.1).

2.11.2.2 Histochemischer β-Glucuronidase-Assay

Zur Lokalisierung von GUS-Reportergenaktivitäten wurden histochemische GUS-Assays durchgeführt (nach Jefferson *et al.*, 1987a und b). Dazu wurden die zu untersuchenden Pflanzen oder Pflanzenteile in GUS-Färbelösung [1 mM X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronsäure), 50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 0,01 % (v/v) Triton X-100] gegeben, zweimal für 5 Minuten vakuumfiltriert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion des Chlorophylls wurden die Pflanzen mehrfach mit 70 % Ethanol gewaschen.

2.11.3 Nachweis der Luciferase-Aktivität

2.11.3.1 Bestimmung der quantitativen Luciferaseaktivität

Es wurden die Luciferaseaktivitäten von Blatt- und Wurzelgewebe von zwei bis drei Monate bzw. sechs bis sieben Monate alten Zuckerrüben bestimmt.

Für die Bestimmung der LUC-Aktivität von Blattgewebe wurden 10 Blatttrondelle mit einem Korkbohrer aus einem Blatt herausgestanzt. Das entnommene Blattmaterial wurde auf einer Feinwaage gewogen, daraufhin mit 4 Volumen 1x Cell-Culture-Lysis-Reagenz (Promega) versetzt und mit Hilfe eines Eppendorfmörser (Heidolph, RZR 2020) aufgearbeitet. Die Proben wurden anschließend für mindestens 20 min in einer Eppendorftischzentrifuge auf höchster Stufe bei 4°C zentrifugiert. Für die Messung der Luciferaseaktivität wurden 10 µl

des Überstandes (entspricht dem Überstand von 2 µg Blattgewebe) in ein 5 ml Röhrchen (Sarstedt, Art.Nr. 55.476) gegeben und mit 100 µl Luciferase-Assay-Reagent (aus: Luciferase-Assay-System, Promega) vermischt. Die Messung der LUC-Aktivität erfolgte im Sirius-Luminometer von Bertholt bei einer Vormesszeit von 2 Sekunden und einer Messzeit von 10 Sekunden. Die Messwerte wurden in der Einheit RLU/s ausgegeben. Da jeweils für die Messungen äquivalente Mengen an Überstand eingesetzt worden sind, wurden diese Werte direkt, d. h. ohne Umrechnungen, für die Bestimmung der Mittelwerte der Luciferase-Aktivität eingesetzt. Die Berechnung des mittleren Fehlers des Mittelwertes erfolgte wie in Kap. 2.13 beschrieben.

Für die Bestimmung der LUC-Aktivität des Wurzelgewebes von Zuckerrüben wurden 0,6 g bis 0,8 g Wurzelgewebe mit 8 Volumen CCLR-Puffer im kleinsten Aufsatz eines Waring-Blenders aufgearbeitet. Danach wurde 1 ml des Lysats in einer Eppendortischzentrifuge bei 4°C und 14000 rpm für mindestens 3 min abzentrifugiert. Die Messung der LUC-Aktivität erfolgte analog zu den Messungen für das Blattgewebe. Für die Bestimmung der LUC-Aktivität des Wurzelgewebes alter Zuckerrüben wurden ca. 1,25 g Wurzelgewebe (Probengemisch) eingesetzt.

Da für die Aufarbeitung von Wurzelgewebe das achtfache Volumen an CCLR-Puffer eingesetzt wurde, während für die Aufarbeitung von Blattgewebe lediglich das vierfache Volumen eingesetzt wurde, wurden für die Auswertung die für Wurzelgewebe gemessenen Luciferase-Werte mit dem Faktor 2 multipliziert.

2.11.3.2 Histochemische Luciferase-Assays

Es wurden histochemische Luciferase-Assays mit transgenen Zuckerrüben durchgeführt, die Promotor-LUC-Fusionen von fünf wurzelspezifischen Promotoren der Zuckerrübe enthalten. Zur Lokalisierung der Aktivität von transformierten Promotor-LUC-Konstrukten in der Zuckerrübenwurzeln wurden von diesen Längs- und Querschnitte angefertigt und für mindestens 2 Stunden in einer Lösung, die Luciferin enthielt [100 µM Luciferin; 5% (v/v) DMSO], bei Dunkelheit inkubiert. Die Wurzelscheiben wurden nach der Inkubation zunächst beleuchtet photographiert. Der Nachweis der Reportergenaktivität (Lichtemission) erfolgte anschließend bei Dunkelheit mit Hilfe einer MicroMAX Digital CCD Kamera (Visitron Systems). Für Detailaufnahmen wurde das Stereomikroskop Stemi 2000 (Zeiss) eingesetzt, das mit Hilfe eines HRD-Mikroskop-Adaptors in die Kamera eingebaut worden war. Zur genauen Lokalisation der Lichtemission konnten die Hell- und Dunkelaufnahmen überlagert werden. Auf diesen Darstellungen ist die Reportergenaktivität für eine bessere Veranschaulichung rot eingefärbt.

2.11.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde für die Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht eingesetzt. Sie wurde in einem diskontinuierlichem System mit einem Tris-Glycin-Puffer nach Laemmli *et al.* (1970) durchgeführt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden mit einem Volumen Ladepuffer vermischt [6,5% (v/v) Glycerin, 20 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,03% (w/v) Bromphenolblau, 0,75% (w/v) SDS; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol], fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Das diskontinuierliche Gelsystem bestand aus einem 10 % oder 12 % Trenngel und einem 4% Sammelgel. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel bzw. 90-100 V im Trenngel. Als Größenstandard wurde der Prestained Protein Molecular Weight Marker von Fermentas eingesetzt (SM0441). Alternativ erfolgte die Auftrennung von Proteinen mit dem Nu-PAGE-System und vorgefertigten Gelen der Firma Invitrogen.

Zur Anfärbung der Proteine im Gel wurden die Gele nach der Auftrennung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Blue-Färbelösung [0,03 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue, 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure] inkubiert. Die Entfärbung erfolgte bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 30% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure.

2.11.5 Acid-Urea Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Essigsäure-Harnstoff Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Acid-Urea Gelelektrophorese (AU PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe und ihrer Ladung (Hardison und Chalkley, 1978). Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch AU PAGE säurelösliche Kernproteine aus *Arabidopsis thaliana* aufgetrennt (Kap. 2.11.6). Zur Herstellung des Trenngels wurden 7,28 g Harnstoff in 11,2 ml 30 % Polyacrylamidlösung [Rotiphorese®30-Gel (37,5:1)], 1 ml konzentrierter Essigsäure und 3 ml ddH₂O gelöst. Die Lösung wurde für 5 min im Wasserstrahlvakuum entgast. Nach Zugabe von 100 μ l TEMED und 100 μ l 10 % (w/v) APS wurde das Gel zwischen vorbereitete Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol mit Whatman-Filterpapier entnommen und das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet. Das Sammelgel setzte sich aus 1,7 ml 30 % Polyacrylamid [Rotiphorese®30-Gel (37,5:1)], 2,92 g Harnstoff, 200 μ l konzentrierter Essigsäure, 3 ml ddH₂O, 50 μ l TEMED und 100 μ l 10 % (w/v) APS zusammen. Vor dem Auftragen der Proben wurde ein einstündiger Vorlauf bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 5 % (v/v) Essigsäure eingesetzt.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Proben mit einem Volumen Ladepuffer [8 M Harnstoff, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 6 % Essigsäure, 0,01 % (w/v) Methylenblau]

versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde bei 30 mA durchgeführt, bis die Methylenblaubande das untere Ende des Gels erreicht hatte (Dauer ca. 3 h). Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Protan® Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll) erfolgte modifiziert nach Whitfield *et al.* (1996). Das Gel wurde zunächst für 2 Stunden in Äquilierungspuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycine, 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Anschließend wurden drei auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene Whatman Filterpapiere in Transfer-Puffer getränkt (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycine, 20 % (v/v) Methanol, 1 % (w/v) SDS) und luftblasenfrei auf die Kathode eines Semi-Dry-Blotters (Pegasus, Phase GmbH) gelegt. Das Gel wurde kurz in Transfer-Puffer getaucht und auf die Whatman-Filterpapiere gelegt. Es folgten die Nitrozellulosemembran sowie zwei weitere, in Transfer-Puffer getränkte Whatman-Filterpapiere. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer Stromstärke von 100 mA (Dauer ca. 1 h). Western-Blot-Analysen wurden wie in Kap. 2.11.9 beschrieben durchgeführt.

2.11.6 Aufreinigung von säurelöslichen Kernproteinen aus *Arabidopsis thaliana*

Histone sind basische Proteine und lassen sich deshalb durch Säuren wie 0,2 N H₂SO₄ extrahieren. Säurelösliche Kernproteine wurden aus *Arabidopsis thaliana* aufgereinigt, um einen Silencing-Effekt der *in planta* transformierten ihp-RNA Konstrukte (Kap. 2.8.3) auf Proteinebene mittels Western-Blot nachzuweisen.

Die Aufreinigung von säurelöslichen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Li *et al.* (2001) durchgeführt. Dazu wurden 2-3 g frisches Blattmaterial unter flüssigen Stickstoff fein gemörsert und in 30 ml eiskaltem Kernisolationspuffer I resuspendiert [1 M Hexylenglycol (Roth); 20 mM Pipes KOH pH 6,5; 0,3 % (v/v) Triton X-100; 20 mM KCl; 0,5 mM EDTA pH 8,0; 0,05 mM Spermin (Sigma); 0,125 mM Spermidine (Sigma); 7 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF); 10 mM Natriumfluorid (Fluka); 1 mM Natriumorthovanadat (Sigma)]. Die Suspension wurde durch 4 Lagen Haushaltspapier filtriert und bei 4°C 10 min bei 2000g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 20 ml eiskaltem Kernisolationspuffer II gewaschen (Wie Kernisolationspuffer I, jedoch 0,5 M statt 1 M Hexylenglycol). Die Zellkerne wurden in 2 ml eiskaltem Kernresuspensionspuffer [10 mM Tris-HCl; pH 7,5, 3 mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 1 mM Phenylmethansulfonsäurefluorid, 10 mM NaF; 1 mM Natriumorthovanadat] resuspendiert und zweimal 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Zur Extraktion von säurelöslichen Proteinen wurde konzentrierte Schwefelsäure zu einer Endkonzentration von 0,2 N (0,4 M) zugegeben, für 30 min auf Eis inkubiert und dabei alle 5 min gevortext. Die Suspension wurde bei 4°C 10 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Die im

Überstand befindlichen säurelöslichen Proteine wurden durch Zugabe von drei Volumen 20 % (w/v) Trichloressigsäure (Roth) und 30 Minuten Inkubation auf Eis gefällt. Anschließend wurde der Präzipitationsansatz 15 min bei 15000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Die säurelöslichen Proteine wurden in 75 µl ddH₂O gelöst, dem PMSF (Endkonzentration 1 mM) und NaF (Endkonzentration 10 mM) zugegeben worden waren. Bestandteile des Pellets, die sich nicht lösten, wurden abzentrifugiert und verworfen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie in Kap. 2.11.1 beschrieben. Die säurelöslichen Kernproteine wurden bei –20°C gelagert.

2.11.7 Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Linker-Histon-Varianten mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Für die Überexpression und die Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung von 6x His getaggtten, rekombinanten Linker-Histon-Varianten wurde eine 5 ml Übernachtskultur des M15[pREP4]-Stammes, der das jeweilige Expressionskonstrukt enthielt (Tab. 10), in LB [mit 100 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin] angesetzt. Die Übernachtskultur wurde in 100 ml frisches LB-Medium überführt (Antibiotikakonzentrationen wie oben) und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Induktion der Proteinüberexpression wurde durch Zugabe von IPTG gestartet (Endkonzentration 1mM). Die Bakteriensuspension wurde fünf Stunden bei 37°C kultiviert, daraufhin wurden die Bakterienzellen durch 10 min Zentrifugation bei 3500g pelletiert und zum Zellaufschluss in 5 ml Lysispuffer [100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 6 M Guanidin-Hydrochlorid pH 8,0] resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch eine 60 minütige Inkubation auf einem Rollenmischer bei Raumtemperatur. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde die Suspension 30 min bei 10000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Ni-NTA-Agarose-Suspension (Invitrogen) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Bindung der rekombinanten, 6x His getaggtten Proteine an die Ni-NTA-Agarose. Anschließend wurde die Suspension auf eine Säule gegeben und mit 4 ml Puffer C [100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff pH 6,3] gewaschen. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte zunächst mit 4x 0,5 ml Puffer D [100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff pH 5,9] und anschließend mit 4x 0,5 ml Puffer E [100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff pH 4,5]. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und auf einem SDS-Gel analysiert. Fraktionen, die rekombinantes Protein enthielten, wurden bei –20°C gelagert.

2.11.8 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

2.11.8.1 Kopplung von Linker-Histon spezifischen Peptiden an Affigel-10

Für die Affinitätsaufreinigung der Antikörper gegen His1-1, His1-2 und His1-3 aus Serum wurden zunächst die für die Linker-Histon-Varianten spezifischen Peptide (Kap. 2.7) kovalent an das Säulenmaterial Affigel-10 (Bio-Rad) gebunden. Affigel 10 enthält als reaktive Gruppe ein N-Hydroxysuccinimidester, das über einen 10-Kohlenstoff-Spacer mit einer Agarose-Matrix verbunden ist. Zur Kopplung der Peptide an das Gel wurde ein Gelvolumen von ca. 1 ml in eine Säule gegeben (Poly-Prep-Column, Bio-Rad) und zunächst mit 5 Volumen eiskaltem Isopropanol und danach mit 5 Volumen DMF gewaschen. Mit einer Pasteurpipette wurde das Säulenmaterial entnommen, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und kurz anzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, daraufhin wurden 3 ml DMF hinzugegeben, in denen jeweils 5 mg des entsprechenden Peptids gelöst waren. Die Kopplung an das Säulenmaterial erfolgte über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4°C. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde der Überstand entnommen und das Säulenmaterial zur Absättigung der freien Bindestellen mit 3 ml 100 mM Ethanolamine (pH 8,0) versetzt. Es folgte eine dreistündige Inkubation auf einem Rollenmischer bei 4°C. Abschließend wurde das Säulenmaterial dreimal mit 5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Das Säulenmaterial wurde entweder sofort für die Affinitätsaufreinigung von Antikörpern aus Serum eingesetzt oder in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 0,02 % (w/v) Natriumazid und 1 mM PMSF aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.11.8.2 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern gegen Linker-Histon Varianten

Die Matrix, an die die Linker-Histon spezifischen Peptide gekoppelt worden waren (Kap. 2.11.8.1), wurde zur Affinitätsaufreinigung von Antikörpern auf eine Säule gegeben (Poly-Prep-Column, Bio-Rad) und zunächst mit 10 ml kaltem 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Es folgte ein Waschschriff mit 10 ml 100 mM Glycine (pH 2,5). Anschließend wurde die Säule so lange mit kaltem 10 mM Tris-HCl (pH 8,8) gespült, bis der pH-Wert des Durchflusses ungefähr pH 8,8 erreicht hatte. Für die Überprüfung des pH-Wertes wurde pH-Papier eingesetzt. Es folgte ein Waschschriff mit 10 ml frisch angesetztem 100 mM Triethylamin (pH 11,5). Daraufhin wurde die Säule so lange mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gespült, bis der Durchfluss einen pH-Wert von ca. 7,5 erreicht hatte.

Jeweils 10 ml Serum mit den polyklonalen Antikörpern gegen His1-1, His1-2 bzw. His1-3 (Kap. 2.7) wurden affinitätsgereinigt. Das Serum wurde mit 4 Volumen eiskaltem Tris-HCl (pH 7,5) verdünnt und 30 min bei 4°C bei 20000 g zentrifugiert. Zur spezifischen Bindung der Antikörper an die Matrix wurde der Überstand auf die vorbereitete Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen und erneut auf die Säule aufgetragen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Danach folgten Waschschriffe mit 20 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) bzw. mit 20 ml

einer Lösung aus 500 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Zur Elution der Antikörper wurden 10 ml 100 mM Glycine (pH 2,5) auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 1 ml in Eppendorfgefäßen aufgefangen, in denen jeweils 100 µl 1M Tris-HCl (pH 8,8) vorgelegt worden waren. Nach der ersten Elution der Antikörper wurde die Säule wie oben beschrieben mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,8) gespült. Es folgte eine Elution mit 10 ml 100 mM Triethylamin (pH 11,5). Auch hier wurde das Eluat in Fraktionen von ca. 1 ml in Eppendorfgefäßen mit jeweils 100 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0) aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Immunreaktion gegen das jeweilige Peptid mit auf Nitrozellulose aufgetragenem Peptid (0,1 ng, 1 ng, 10 ng) getestet. Die Fraktionen, die eine Reaktion gegen das jeweilige Peptid zeigten, wurden vereinigt, mit 0,02 % (w/v) Natriumazid versetzt und aliquotiert. Ein Teil der Aliquots wurde bei 4°C gelagert, der Rest bei -20°C eingefroren.

2.11.9 Western-Blot-Analyse

Für Western-Blot-Analysen wurde zunächst eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit den zu untersuchenden Proteingemischen durchgeführt, anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protan[®], Schleicher und Schüll) geblottet. Für das Blotten wurden drei auf die Größe des Gel zurechtgeschnittene Whatman-Filterpapiere in Kathodenpuffer [25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol] getränkt und luftblasenfrei auf die Kathode eines Semi-Dry-Blotters (Pegasus, Phase GmbH) gelegt. Auf die Whatman-Filterpapiere wurde das Polacrylamidgel gelegt und auf dieses eine zuvor in Anodenpuffer I [30 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol] getränkte Nitrozellulosemembran. Es folgten drei Lagen in Anodenpuffer I und drei Lagen in Anodenpuffer II [300 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol] getränktes Whatman-Filterpapier. Der Transfer wurde für 1 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² durchgeführt. Danach konnten die geblotteten Proteine mit einer Ponceaurot-Lösung [0,1 % (w/v) PonceauS, 3 % (v/v) Essigsäure] angefärbt werden.

Für die Immundetektion wurde der Blot eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer in Blocking-Lösung [5 % (w/v) Magermilchpulver und 0,01 % (v/v) Tween-20 in TBS; TBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7,6)] inkubiert, danach gut mit TBS gespült und zweimal 5 min mit 10 ml TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Primäantikörper. Dazu wurde der Primäantikörper (Kapitel 2.11.8.2) 1:500 in TBS-I [0,5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS] verdünnt. Die Membran wurde für eine Stunde in dieser Lösung auf einem Rollenmischer inkubiert und daraufhin zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper gut mit TBS gespült und zweimal 5 min mit jeweils 10 ml TBS gewaschen. Es schloss sich eine einstündige Inkubation mit Peroxidase markiertem Sekundäantikörper (aus: „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“, Amersham

Biosciences, 1:2000 verdünnt in TBS-I) bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer an. Zuletzt wurde die Membran viermal 10 min mit jeweils 10 ml TBS-T [0,01 % (v/v) Tween-20 in 1x TBS], und zweimal 5 min mit TBS gewaschen. Die Peroxidase-Reaktion wurde mit dem „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Nachweis der Peroxidase-Reaktion wurde der Blot bei Raumtemperatur gegen einen Hyperfilm MP-Röntgenfilm exponiert.

2.12 Arbeiten mit Pflanzen

2.12.1 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

2.12.1.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis-Samen wurden entweder auf Erde (Pflanzerde, Compo) oder auf 0,5x Murashige-Skoog-Medium (MS) mit Nährsalzen und Vitaminen und 1 % (w/v) Saccharose kultiviert [2,15 g/l MS (Duchefa, #M0255), 10 g/l Saccharose, 8 g/l Agar, pH 5,9]. Für die Anzucht auf MS-Medium wurden die Samen vor der Aussaat in einem Eppendorfgefäß 2 min mit 1 ml 70 % Ethanol und 8 min mit 1 ml Sterilisierlösung [3 % (v/v) Natriumhypochlorid, 0,1 % (v/v) Triton X-100] behandelt und anschließend viermal mit 1 ml sterilem dH₂O gewaschen. Zur Ausplattierung wurden die Samen in 0,1 % (w/v) Agarose aufgenommen.

Die ausgesäten Samen wurden für mindestens 48 h bei 4°C im Dunkeln stratifiziert, bevor sie in eine Klimakammer (Percival Scientific) gestellt wurden. Die Pflanzen wurden bei einer konstanten Temperatur von 24°C unter Langtagbedingungen (18h Tag/ 6h Nacht) kultiviert. Zur Samenernte wurde das oberirdische Pflanzenmaterial mit den Schoten abgeschnitten und in ein Blatt DIN A4-Papier eingewickelt. Die Samenschoten wurden durch Druck auf das Papier aufgebrochen. Mit einem handelsüblichen Teesieb wurden die Samen von den übrigen Pflanzenteilen abgetrennt. Die Lagerung der geernteten Samen erfolgte bei Raumtemperatur oder bei 4°C.

2.12.1.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels Floral-dip

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde der Floral-Dip nach Clough *et al.* (1998) eingesetzt.

Zur Vorbereitung der *Arabidopsis*-Pflanzen für die Transformation wurden jeweils neun Samen in einem 8x8 cm Pflanztopf ausgelegt. Über die Erde wurde ein Nylonnetz gespannt und mit einem Gummiband befestigt. Nach Ausbildung der ersten primären Infloreszenzen nach ca. 4-5 Wochen wurden sie zur verstärkten Ausbildung von sekundären Infloreszenzen mit einer Nagelschere abgeschnitten. Vier bis sechs Tage nach dem Zurückschneiden der

primären Infloreszenzen wurden die Pflanzen transformiert. Dazu wurden 2 ml einer Übernachtskultur des Agrobakterienstammes, der das jeweils zu transformierende Konstrukt enthielt, in 250 ml LB überführt und für 24 Stunden bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden bei 5000 g für 20 min und bei Raumtemperatur pelletiert und in Infiltrationslösung [5% (w/v) Saccharose, 0,02 % (v/v) Silwet-L-77 (Lehle Seeds)] resuspendiert, so dass die OD₆₀₀ der Suspension ca. 0,8 betrug. In einem 2 l-Becherglas wurden die oberirdischen Pflanzenteile für 5 Sekunden in die Infiltrationslösung getaucht. Danach wurden die Pflanzentöpfe in durchsichtige Plastiktüten gegeben und zunächst 24 h liegend im Klimaschrank gelagert. Die Pflanzen wurden unter den in Kap. 2.12.1.1 beschriebenen Bedingungen zur Samenreife gebracht (Dauer: ca. 4 Wochen). Die Samen wurden geerntet und daraufhin auf transgene Pflanzen selektiert. Zur Selektion transgener Pflanzen wurden die geernteten Samen sterilisiert und auf 0,5x MS mit 1 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das MS-Medium enthielt jeweils den benötigten Selektionsmarker [Kanamycin (Duchefa) 50 µg/ml, DL-Phosphinothricin (Duchefa) 20 µg/ml, Hygromycin B (Hoffmann-La Roche) 25 µg/ml, Methothrexat (Duchefa) 0,2 µg/ml]. Nach zwei Wochen wurden die selektierten Pflanzen in Erde umgesetzt und zur Samenreife gebracht. Durch Aussaat der geernteten Samen auf Medium mit dem jeweiligen Selektionsmarker wurde überprüft, ob sie tatsächlich transgen sind. Weiterhin wurde über eine Segregationsanalyse die Anzahl der T-DNA-Loci bestimmt.

2.12.1.3 Identifizierung von homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten mittels PCR

Für die Funktionsanalyse von Linker-Histon-Varianten in *Arabidopsis thaliana* wurden über das Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) zwei T-DNA-Insertionslinien für His1-1 (SALK_128430, SALK_021410) bezogen (Alonso et al., 2003). Die gelieferten Samen konnten für die jeweilige T-DNA-Insertion entweder homozygot oder heterozygot sein bzw. die T-DNA-Insertion nicht enthalten. Zur Identifizierung von homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten wurden Samen der einzelnen T-DNA-Insertionslinien auf 0,5x MS-Medium mit 1 % Saccharose ausgelegt und unter den in Kap. 2.12.1.1. beschriebenen Bedingungen kultiviert. Nach ca. zwölf Tagen wurden die Pflanzen in Erde umgesetzt. Nach weiteren 12 Tagen wurde aus Blattmaterial der einzelnen Pflanzen genomische DNA aufgearbeitet (Kap. 2.10.3). Die Identifizierung von für die jeweilige T-DNA-Insertion homozygoten Pflanzen erfolgte durch zwei PCRs, für die die aufgereinigte genomische DNA als Template eingesetzt wurde. Die beiden PCRs sind schematisch in Abb. 3 wiedergegeben.

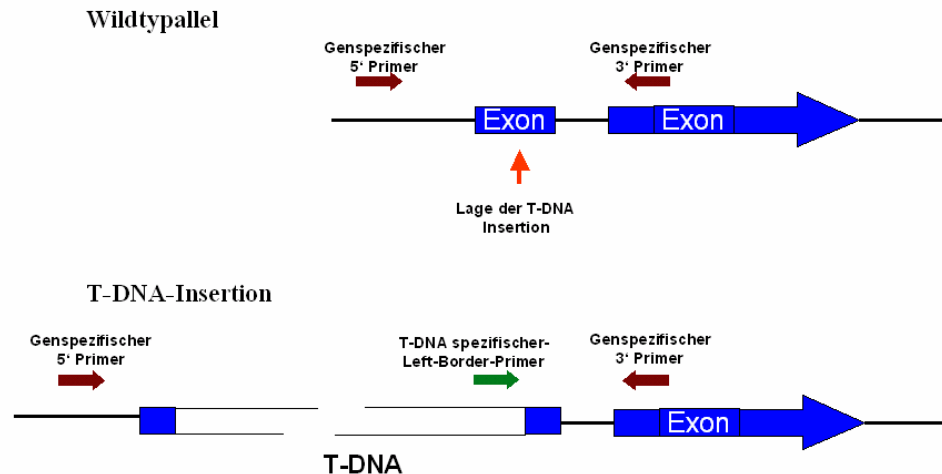


Abb. 3: Schematische Darstellung der zwei Test-PCRs zur Identifizierung von homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten. Die erste PCR amplifiziert das Wildtypallel, die zweite PCR den Bereich zwischen der Left-Border der T-DNA und die flankierende genomische Region. Eine Pflanze ist für die jeweilige T-DNA-Insertion homozygot, wenn nur die zweite PCR ein Amplifikat liefert.

Die erste der beiden durchgeführten PCRs amplifiziert einen Bereich des Wildtypallels. Dazu wurden Oligonukleotide konzipiert, die jeweils 400 bp 5' bzw. 3' der vom Salk-Institut angegebenen Insertionsstelle (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) lagen (Tab. 6). Die zweite PCR amplifiziert einen Bereich zwischen der Left-Border der T-DNA und der flankierenden genomischen Sequenz. Die beiden PCRs wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

2 µl	Template (Kap. 2.11.1.1)
2 µl	10x PCR-Puffer (Qbiogene)
1 µl	Primergemisch (je 12 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 u/µl, Qbiogene oder Invitrogen)
13,8 µl	ddH ₂ O
5 Minuten	94°C
30 Sekunden	94°C
30 Sekunden	61,5°C
90 Sekunden	70°C
2 min	70°C
} 36 Zyklen	

Jeweils 5 µl des PCR-Ansatzes wurden nach Durchführung der PCR auf ein Agarosegel aufgetragen. Eine Pflanze ist homozygot für die entsprechende T-DNA-Insertion, wenn die zweite PCR ein Produkt amplifiziert, nicht aber die erste PCR. Die Position der T-DNA-Insertion im Arabidopsis-Genom wurde durch eine Sequenzierung des Amplifikats aus der

zweiten PCR bestimmt. Pflanzen, die homozygot für die jeweilige T-DNA-Insertion waren, wurden weiter kultiviert. Die Samen dieser Pflanzen wurden geerntet.

2.12.1.4 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana*

Für die Kreuzung von *Arabidopsis* wurden Blütenknospen, deren Pollen noch nicht reif waren, unter einem Binokular mit einer feinen Pinzette (Dumont-Pinzette Nr. 5) geöffnet. Die Antheren wurden vorsichtig entfernt und die Narbe der Blüte mit reifen Pollen des Kreuzungspartners bestäubt. Blütenknospen einer Infloreszenz, die für eine Kreuzung zu klein waren, wurden mit einer Nagelschere entfernt, ebenso offene Blüten mit reifen Pollen. Durchschnittlich konnten zwei bis drei Blütenknospen eines Blütenstandes für eine Kreuzung eingesetzt werden. Die für die Kreuzung eingesetzten Blütenknospen wurden zur späteren Identifikation mit farbigem Nähgarn markiert. Nachdem die Samen reif waren, wurden sie aus den einzelnen Schoten geerntet und auf 0,5x MS-Medium mit geeigneten Selektionsmarkern selektiert (Kap. 2.12.1.2).

2.12.2 Arbeiten mit Tabak (*Nicotiana tabacum*)

2.12.2.1 Kultivierung

Tabaksamen wurden auf 1x MS-Medium [4,3 g/l MS (Duchefa, #M0255), 10 g/l Saccharose, 8 g/l Agar, pH 5,9] ausgelegt und bei 26°C in der Lichtkammer mit einem 12 h-Tag/12 h-Nacht-Rhythmus kultiviert. Nach 3-4 Wochen wurden die Keimlinge in Erde umgesetzt und im Gewächshaus kultiviert. Zur Ernte der Tabaksamen wurden die Samen unter sterilen Bedingungen den Samenkapseln entnommen. Die Lagerung der Samen erfolgte bei Raumtemperatur.

2.12.2.2 Transformation von Tabak mittels Blattscheibentransformation

Für die Transformation von Tabak wurde die Blattscheibentransformation eingesetzt, die auf Agrobakterieninfiltration beruht (Hehl und Baker, 1989; Horsch *et al.*, 1985). Es wurden Promotor-GUS-Konstrukte von 5 Promotoren der Zuckerrübe transformiert (Kap. 2.8.1). Diese Konstrukte vermitteln *in planta* eine Resistenz gegen Kanamycin.

Für die Blattscheiben-Transformation wurden *Nicotiana tabacum* SR1-Pflanzen auf 1x MS-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose 6-8 Wochen unter den in Kap. 2.12.2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Für die Agrobakterieninfiltration wurden Blätter dieser Pflanzen in ca. 0,5 cm² große Blattstücke zerschnitten. Die Blattstücke wurden für 5 Minuten in eine Agrobakteriensuspension gegeben, die aus neun Teilen flüssigem 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und einem Teil frischer Übernachtskultur des entsprechenden Agrobakterienstammes bestand. Anschließend wurden die Blattstücke mit sterilem

Whatman-Papier getrocknet, mit der Unterseite nach oben auf festes 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose gelegt und für zwei Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Agrobakterieninfiltration. Zur Selektion transgener Pflanzenzellen wurden die Blattstücke auf kallusinduzierendes 1x MS-Medium umgelegt [mit 3 % Saccharose, 0,5mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,1mg/l Naphthylsäure, 500mg/l Cefotaxim, 200mg/l Kanamycin] und in der Lichtkammer inkubiert. Sich bildende Kalli, die nach ca. 12 Tagen sichtbar wurden, wurden von den anderen Kalli getrennt und auf sprossinduzierendes Medium umgelegt (wie kallusinduzierendes Medium, aber 2 mg/l 6-Benzylaminopurin). Nach weiteren drei Wochen wurden die Sprosse auf wurzelinduzierendes MS-Medium umgesetzt [3 % Saccharose, 500mg/l Cefotaxim, 200mg/l Kanamycin]. Bewurzelte Pflanzen wurden in Erde umgesetzt und anschließend im Gewächshaus kultiviert. Samen der geselbsteten Pflanzen wurden geerntet (F₁-Generation). Zur Bestimmung der Anzahl der T-DNA-Loci wurde eine Segregationsanalyse mit der F₁-Generation durchgeführt.

2.13 Statistische und computergestützte Methoden

Die Auswertung der Luciferase- und β -Glucuronidasewerte wurde mit der Software „Excel 2000“ von Microsoft durchgeführt. Die Berechnung des mittleren Fehlers des Mittelwertes s_m erfolgte nach der folgenden Formel (Bartsch, 1994):

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Bei „s“ handelt es sich um die Standardabweichung, bei „n“ um die Anzahl der durchgeführten Messungen.

Für *in silico* Restriktionsanalysen von DNA-Sequenzen wurde das Sequenzbearbeitungsprogramm DNA Strider (Version 1.3) eingesetzt. Die Konzeption von Oligonukleotiden für PCR-Analysen erfolgte mit Hilfe der Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Rozen und Skaletsky, 2000).

Die Sequenzen der Promotoren sowie der kodierenden Bereiche der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* wurden der TAIR Datenbank entnommen (www.arabidopsis.org).

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von fünf potentiell wurzelspezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe im homologen und heterologen System

Durch zwei Suppression-Subtractive-Hybridisation Experimente (Diatchenko *et al.*, 1996) waren fünf Gene isoliert worden, die in der Zuckerrübe spezifisch in der Wurzel exprimiert werden, nicht aber im Blatt (Kloos *et al.*, 2002, Hehl und Kloos, persönliche Mitteilung, siehe Einleitung). Die putativen Promotorbereiche dieser Gene lagen vor und sollten unter folgenden Fragestellungen untersucht werden: Vermitteln die Promotoren in der Zuckerrübe tatsächlich eine spezifische Aktivität? Wie stark ist die von ihnen vermittelte Aktivität? In welchen Geweben der Wurzel sind die Promotoren aktiv? Wie verhalten sich die Promotoren in einem heterologen System? Dazu wurden die Promotoren mit unterschiedlichen Reportergenen fusioniert. Hintergrund dieser Experimente ist eine mögliche biotechnologische Anwendung in transgenen Nutzpflanzen für die gewebespezifische Expression von ausgewählten Genen.

3.1.1 Expressionsanalyse der fünf Promotoren im homologen System

Für die Expressionsanalyse der fünf putativ wurzelspezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe wurden Promotor-LUC-Konstrukte hergestellt (Tab. 8) und von der Planta GmbH (Einbeck) stabil in die Zuckerrübe transformiert. Klone der ursprünglichen Transformanten waren durch unterschiedliche PCR-Analysen darauf getestet worden, ob sie transgen sind und wurden für die Luciferase-Assays eingesetzt. Für die quantitative Analyse wurde die Luciferase-Aktivität von Blattgewebe und Wurzelgewebe jeweils von ca. zwei bis drei Monate alten Zuckerrüben bzw. von ca. sechs bis sieben Monate alten Zuckerrüben bestimmt. Da es sich bei den untersuchten Zuckerrüben nicht um Pflanzen handelt, die aus Saatgut aufgegangen sind, sondern um Stecklinge, weisen die untersuchten Rüben zum Teil morphologische Abweichungen zu aus Samen aufgegangenen Zuckerrüben auf. Zur Lokalisierung der Aktivität der transformierten Promotoren in der Zuckerrübenwurzel wurden Längs- und Querschnitte von Zuckerrübenwurzeln angefertigt und in einer Lösung mit dem Substrat Luciferin inkubiert. Der Nachweis der Lichtemission erfolgte mit Hilfe einer MicroMAX Digital CCD Kamera (Visitron Systems).

3.1.1.1 Der BvTlp1 Promotor wird spezifisch im Begleitgewebe des Xylems exprimiert

Für die Bestimmung der quantitativen Luciferase-Aktivität des BvTlp1 Promotor-Reportergenkonstruktes (88-LUC-pGPTV-Bar, Tab. 8) wurden insgesamt 15 voneinander unabhängige Linien untersucht. Als Vergleich wurde die LUC-Aktivität von nichttransgenen

Zuckerrüben bestimmt. 12 der 15 untersuchten Linien weisen Luciferase-Werte auf, die höher als die Werte des Wildtyps sind. Abb. 4 fasst die Ergebnisse der quantitativen Analyse für jede der 12 Linien sowie als Vergleich für den Wildtyp zusammen. Je Linie wurde die Reportergenaktivität von zwei bis drei Pflanzen mit mindestens zwei Messungen ermittelt. Die Auftragung der Werte mit dem Fehler des Mittelwertes erfolgte logarithmisch.

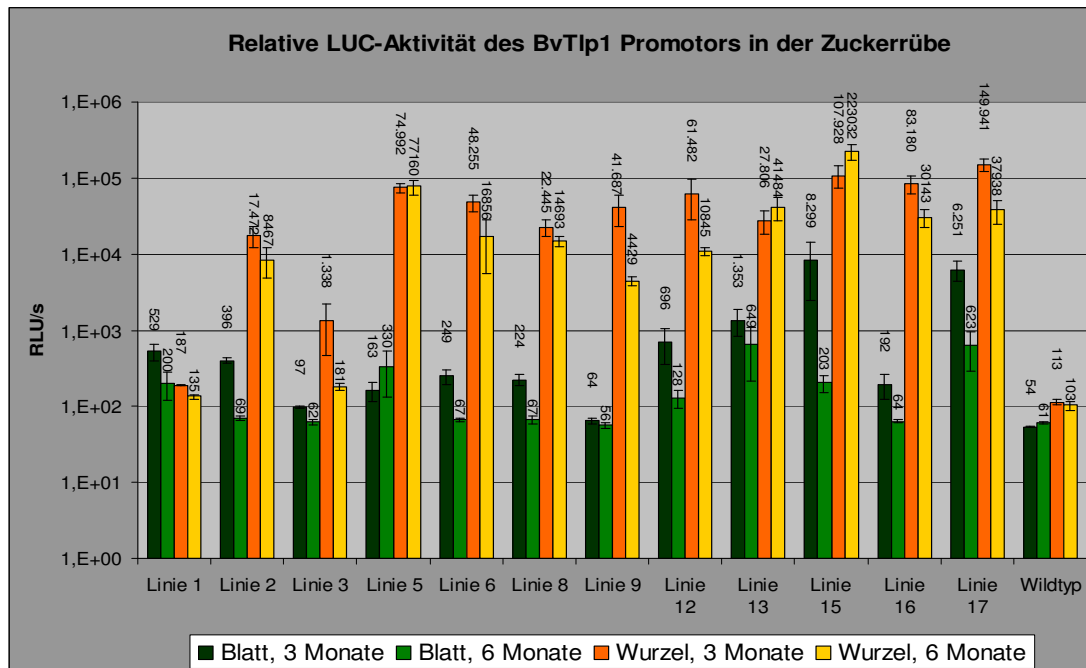


Abb. 4: Quantitative Luciferase-Analyse des BvTlp1 Promotor-Reportergenkonstruktes in der Zuckerrübe. Die Abbildung zeigt die quantitativen Luciferase-Werte für 12 voneinander unabhängige transgene Linien, die ein Promotor-Reportergenkonstrukt für BvTlp1 tragen, sowie als Kontrolle für eine Wildtyplinie. Wurzel- und Blattgewebe ca. 3 bzw. ca. 6 Monate alter Pflanzen wurde analysiert. Die Auftragung der gemessenen Werte ist logarithmisch. Der Promotor wird spezifisch in der Wurzel exprimiert und kaum im Blatt. Mit Ausnahme von Linie 1 weisen alle Linien im Wurzelgewebe eine stärkere Reportergenaktivität als im Blattgewebe auf.

Der BvTlp1 Promotor ist in der Zuckerrübe spezifisch in der Wurzel aktiv und zeigt nur eine geringe Aktivität im Blatt. Mit Ausnahme von Linie 1 ist in den untersuchten Linien die Reportergenexpression in der Wurzel wesentlich höher als im Blatt (Abb. 4). In 10 der 12 Linien (alle außer Linie 1 und 3) ist die Aktivität des Reportergens in jungen bzw. alten Rüben hoch bzw. sehr hoch, in sieben Linien (Linien 2,5,6,8,9,12) ist im Blatt verglichen mit dem Wildtyp keine bzw. kaum Reportergenaktivität nachweisbar. In den Linien 13, 15 und 17, für die im Blattgewebe von 3 Monate alten Pflanzen noch eine leicht erhöhte Aktivität des Promotors gemessen wurde, nimmt die Reportergenaktivität in Blättern von 6 Monate alten Pflanzen stark ab und liegt nur noch schwach über dem Wert der nichttransgenen Kontrolle. Linie 9 weist von den untersuchten transgenen Linien bezogen auf die Expression in der Wurzel das spezifischste Expressionsprofil für das Reportergen auf. In jungen Zuckerrüben

wird in der Wurzel eine ca. 700fach höhere Reporterexpression gemessen als im Blatt. Für die Linien 5 und 16 beträgt der Faktor ca. 400. In der Linie 15, die neben der Linie 3 das Reporter-gen am wenigsten gewebespezifisch exprimiert, hat der Faktor für junge Pflanzen einen Wert von 13, für alte Pflanzen einen Wert von ca. 65. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der BvTlp1 Promotor in der Zuckerrübe spezifisch in der Wurzel, jedoch kaum im Blatt aktiv ist.

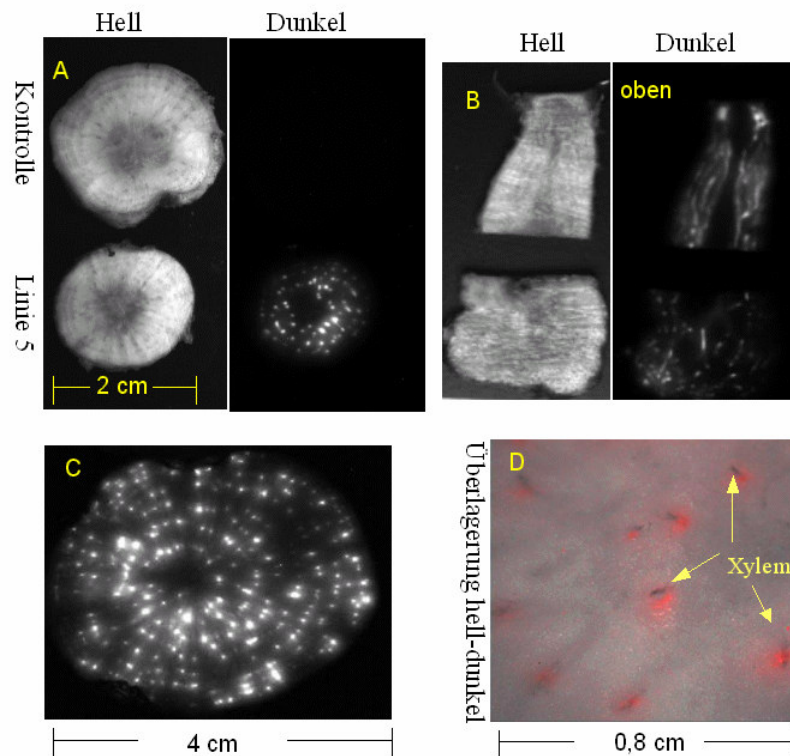


Abb. 5: Expressionsprofil des BvTlp1 Promotors in der Wurzel der Zuckerrübe. Histochemische Luciferase-Assays wurden mit Wurzelquer- und längsschnitten ca. 3 bzw. 6 Monate alter Zuckerrüben durchgeführt, die ein BvTlp1 Promotor-Reporter-genkonstrukt tragen. **A.** Querschnitt von Linie 5 sowie von einer nichttransgenen Kontrolle (Hell- und Dunkel Aufnahme) **B.** Zuckerrübenlängsschnitt 3 Monate alter Zuckerrüben, Linie 5. In der Mitte des Längsschnittes fehlt der für die Erstellung von Abb. A eingesetzte Bereich. **C.** Reporter-genaktivität im Querschnitt einer 6 Monate alten Zuckerrübe, Linie 15. **D.** Mikroskopische Detailaufnahme einer 6 Monate alten Wurzelscheibe von Linie 15. Überlagerung einer Hell- und Dunkel Aufnahme. Die Reporter-genaktivität ist rot eingefärbt. Der BvTlp1-Promotor ist aktiv im Xylemparenchym der Zuckerrübenwurzel. Im übrigen Wurzelquerschnitt ist keine Reporter-genaktivität nachweisbar. Die nichttransgene Linie zeigt keine Lichtemission.

Zur Lokalisierung der Reporter-genaktivität des BvTlp1 Promoter-LUC-Konstruktes in der Wurzel wurden histochemische Luciferase-Assays durchgeführt. Insgesamt wurden 4 voneinander unabhängige Linien analysiert (Linien 5, 6, 12, 15). Alle untersuchten Linien wiesen das gleiche Expressionsprofil auf (nicht gezeigt). Abb. 5 zeigt das histochemische Expressionsprofil des BvTlp1 Promotors für drei Monate alte und sechs Monate alte

Zuckerrüben von Pflanzen der Linien 5 und 15 sowie als Kontrolle für den Wildtyp. Die Reportergenaktivität ist in den vaskulären Bereichen der Zuckerrübenwurzel nachweisbar. Sie ist punktuell auf kleine Bereiche beschränkt und sehr spezifisch, da in den übrigen Bereichen der Rübe keine Hintergrundaktivität nachweisbar ist (Abb. 5a und c). Für eine detailliertere Lokalisation der Luciferase-Aktivität wurde ein Ausschnitt eines Wurzelquerschnittes sechs Monate alter Wurzeln mikroskopisch untersucht (Abb. 5d). Die mikroskopische Analyse zeigt, dass sich die Aktivität des Promotor-Reportergenkonstruktes auf die Bereiche um die einzelnen Xylemstränge beschränkt. Hier befindet sich das Xylemparenchym, das eine Rolle für die Be- und Entladung des Xylems sowie bei der Speicherung von Saccharose spielt. Die histochemische Analyse eines Wurzellängsschnittes zeigt, dass sich die Aktivität des Promotors auf den Bereich des Xylemparenchyms über den gesamten Längsschnitt erstreckt (Abb. 5b).

Der BvTlp1 Promotor wird gewebespezifisch in der Rübe im Begleitgewebe des Xylems exprimiert. In den übrigen Geweben der Zuckerrübe wurde kaum Reportergenaktivität nachgewiesen.

3.1.1.2 Der BvHis1-r Promotor wird in der Rübe stärker exprimiert als im Blatt und zeigt eine erhöhte Expression im Xylemparenchym der Rübe

Für die Bestimmung der quantitativen Luciferase-Aktivität des BvHis1-r Promotor-Reportergenkonstruktes (47-LUC-pGPTV-Bar, Tabelle 8) wurden vier voneinander unabhängige Linien untersucht. Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse für diese vier Linien. Für alle vier Linien werden in Wurzel und Blatt höhere Luciferase-Werte als im Wildtyp gemessen. Jedoch zeigt der BvHis1-r Promotor eher eine Spezifität für die Wurzel, da er in allen vier Linien in der Wurzel stärker exprimiert wird als im Blatt. Für junge Pflanzen werden in der Wurzel ca. sechs (Linie 10) bis sechzigfach (Linie 5) höhere LUC-Werte gemessen als im Blatt (Abb. 6). Im Falle der untersuchten 6 Monate alten Zuckerrüben ist die Reportergenaktivität in der Wurzel für Linie 5 achtzigmal so hoch wie im Blatt und für Linie 8 und 10 jeweils viermal so hoch. Linie 1 weist in der Wurzel ca. 6 Monate alter Zuckerrüben nur leicht höhere Luciferase-Werte als im Blatt auf.

Für die histochemische Analyse wurden zwei der vier Promotor-Reportergenlinien untersucht (Linien 5 und 10). Das Expressionsprofil ist in beiden Linien identisch (nicht gezeigt). Abb. 7 zeigt die Ergebnisse der histochemischen Analyse für junge und alte Zuckerrübenwurzeln von Linie 5. Der Promotor ist in jungen und alten Pflanzen über den gesamten Rübenquerschnitt aktiv (Abb. 7a und c). Zusätzlich gibt es, über den gesamten Querschnitt verteilt, kleine, punktförmige Bereiche mit einer erhöhten Expression der Luciferase. Diese Bereiche sind konzentrisch um das zentrale Xylem angeordnet. Der vergrößerte Ausschnitt 6 Monate alter Wurzeln zeigt, dass es sich bei den Bereichen mit erhöhter Expression um das

Gewebe handelt, das das Xylem umgibt, das Xylemparenchym (Abb. 7d). Der histochemische Assay eines Wurzellängsschnitts zeigt, dass der Promotor über den gesamten Längsschnitt aktiv ist (Abb. 7b).

Der BvHis1-r Promotor weist in der Wurzel eine höhere Aktivität als im Blatt auf. In der Wurzel wird der Promotor am stärksten im Bereich des Xylemparenchyms exprimiert.

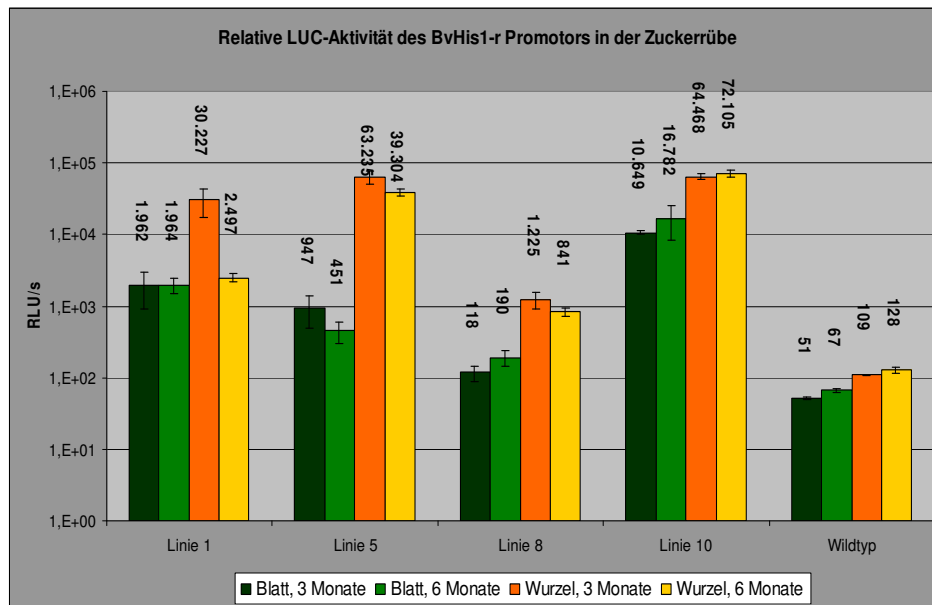


Abb. 6: Quantitative Luciferase-Analyse des BvHis1-r Promotor-Reportergenkonstruktes in der Zuckerrübe. Übersicht über die quantitativen Luciferase-Werte für vier voneinander unabhängige transgene Linien, die ein Promotor-Reportergenkonstrukt für BvHis1-r tragen, sowie als Kontrolle für eine Wildtyplinie. Wurzel- und Blattgewebe ca. 3 bzw. ca. 6 Monate alter Pflanzen wurden analysiert. Die Auftragung der gemessenen Werte ist logarithmisch. Der Promotor vermittelt eine Luciferase-Aktivität in Blatt und Wurzel, jedoch sind die Luciferase-Werte für Wurzelgewebe höher als für das Blattgewebe.

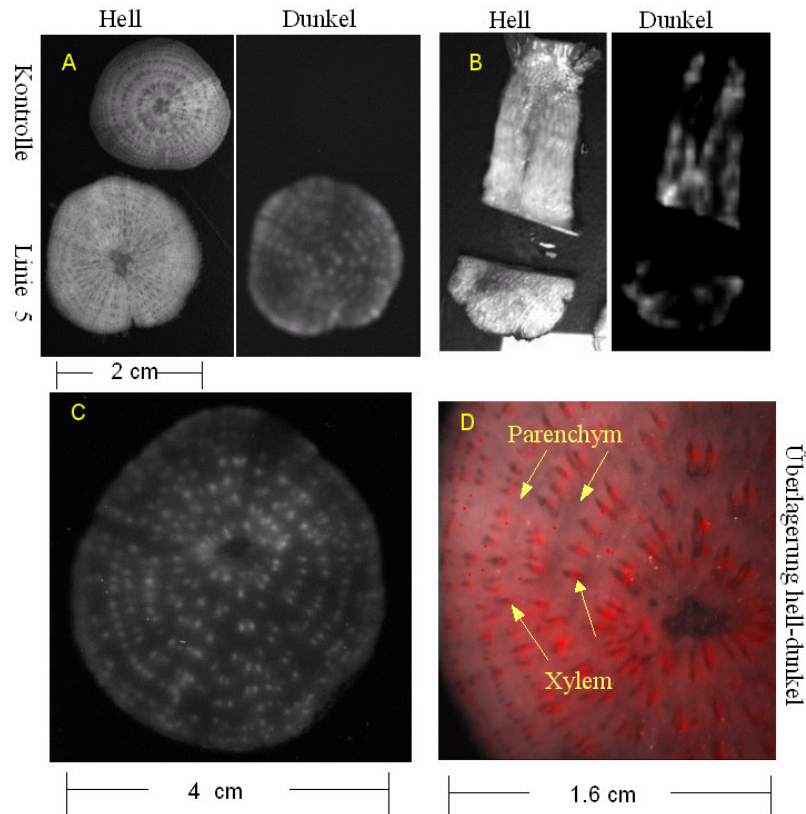


Abb. 7: Expressionsprofil des BvHis1-r Promotors in der Wurzel der Zuckerrübe. Histochemische Luciferase-Assays wurden von Wurzelquer- und längsschnitten 3 bzw. 6 Monate alter Zuckerrüben durchgeführt, die ein BvHis1-r Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. **A.** Wurzelquerschnitt einer 3 Monate alten Zuckerrübe von Linie 5 sowie von einer nichttransgenen Kontrolle (Hell- bzw. Dunkelaufnahme) **B.** Zuckerrübenlängsschnitt 3 Monate alter Zuckerrüben, Linie 5. **C.** Querschnitt einer 6 Monate alten Wurzelscheibe, Linie 5. **D.** Mikroskopische Detailaufnahme einer 6 Monate alten Wurzelscheibe von Linie 5. Überlagerung einer Hell- und Dunkelaufnahme. Der Promotor von BvHis1-r ist im Xylemparenchym der Zuckerrübenwurzel am stärksten aktiv, zeigt aber auch eine schwächere Aktivität im übrigen Wurzelquerschnitt. Die nichttransgene Linie zeigt keine Lichtemission.

3.1.1.3 Der BvMII Promotor wird sehr stark in der gesamten Wurzel exprimiert, jedoch kaum im Blatt

Für die quantitative Bestimmung der Luciferase-Aktivität des BvMII Promotor-Reportergenkonstruktes (48-LUC-pGPTV-Bar, Tab. 8) wurden 12 voneinander unabhängige Linien untersucht. Sieben dieser Linien weisen eine Luciferase-Aktivität auf, die größer als in der nichttransgenen Kontrolle ist. Abb. 8 fasst die für diese sieben Linien gemessenen LUC-Werte zusammen.

Der BvMII Promotor ist hinsichtlich der Wurzelexpression der spezifischste der fünf untersuchten Promotoren. Er vermittelt mit Ausnahme von Linie 3 eine starke Expression in Wurzeln von jungen und alten Pflanzen; in Blättern ist verglichen mit der nichttransgenen Kontrolle fast keine Reportergenexpression nachweisbar. Für Wurzeln sechs Monate alter

Pflanzen der Linie 9 wurden Luciferase-Werte gemessen, die mehr als 4000fach höher waren als die für Blattgewebe. Junge Pflanzen der Linien 2, 9 und 10 weisen die höchsten Luciferase-Werte von allen im Rahmen der Luciferase-Assays untersuchten transgenen Zuckerrübenlinien auf. In Wurzelgewebe 6 Monate alter Zuckerrüben ist die Luciferase-Aktivität ebenfalls sehr hoch, jedoch etwas geringer als in Wurzeln 3 Monate alter Zuckerrüben.

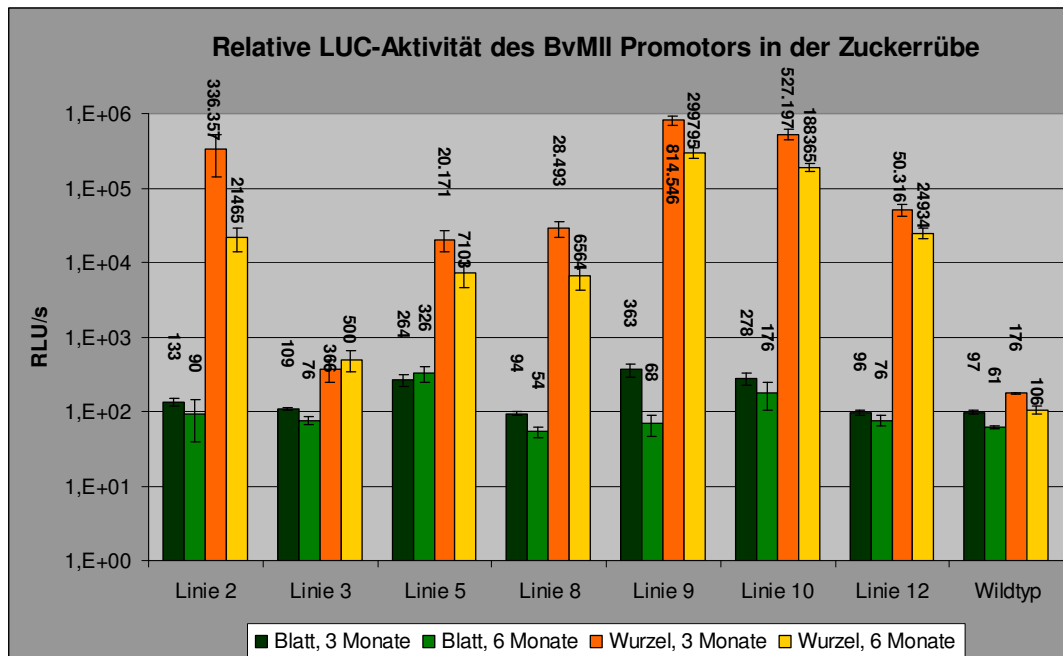


Abb. 8: Quantitative Luciferase-Analyse des BvMII Promotor-Reportergenkonstruktes in der Zuckerrübe. Dargestellt sind die gemessenen Luciferase-Werte für sieben voneinander unabhängige transgene Linien, die ein Promotor-Reportergenkonstrukt für BvMII tragen, sowie als Kontrolle für eine Wildtypelinie. Wurzel- und Blattgewebe ca. 3 bzw. ca. 6 Monate alter Pflanzen wurden analysiert. Die Auftragung der gemessenen Werte ist logarithmisch. Der Promotor wird wurzelspezifisch exprimiert. Im Blattgewebe ist im Vergleich zur nichttransgenen Kontrolle kaum Luciferase-Aktivität nachweisbar.

Für die Analyse des histochemischen Expressionsprofils von BvMII wurden drei voneinander unabhängige Promotor-Reportergenlinien untersucht (Linien 2, 9, 10, 12). Die Linien weisen ein identisches histochemisches Expressionsprofil auf (nicht gezeigt).

Abb. 9 zeigt die Ergebnisse der histochemischen LUC-Analyse von Wurzellängs- und querschnitten 3 und 6 Monate alter Pflanzen von Linie 9 bzw. Linie 10. Der BvMII Promotor vermittelt in jungen und alten Zuckerrüben fast in der gesamten Wurzel eine Expression des Reportergens (Abb. 9b).

Der BvMII Promotor ist sowohl in den vaskulären Bereichen als auch in den Bereichen, die fast ausschließlich aus Parenchymzellen bestehen, aktiv (Abb. 9c). Scheinbar vermittelt er in den vaskulären Bereichen die höchste Expression des Reportergens. Diese Bereiche bestehen neben den Leitgefäßen zu einem großen Teil aus Parenchymzellen (siehe Einleitung), so dass der Promotor vermutlich in allen Parenchymzellen der Wurzel aktiv ist. In

den Parenchymzellen der vaskulären Bereiche ist die Konzentration an gespeicherter Saccharose am höchsten (Elliot und Weston, 1993).

Der BvMII Promotor wird sehr stark in Zuckerrübe im gesamten Gewebe der Rübe exprimiert und nicht im Blatt. Er ist der spezifischste der fünf untersuchten Promotoren.

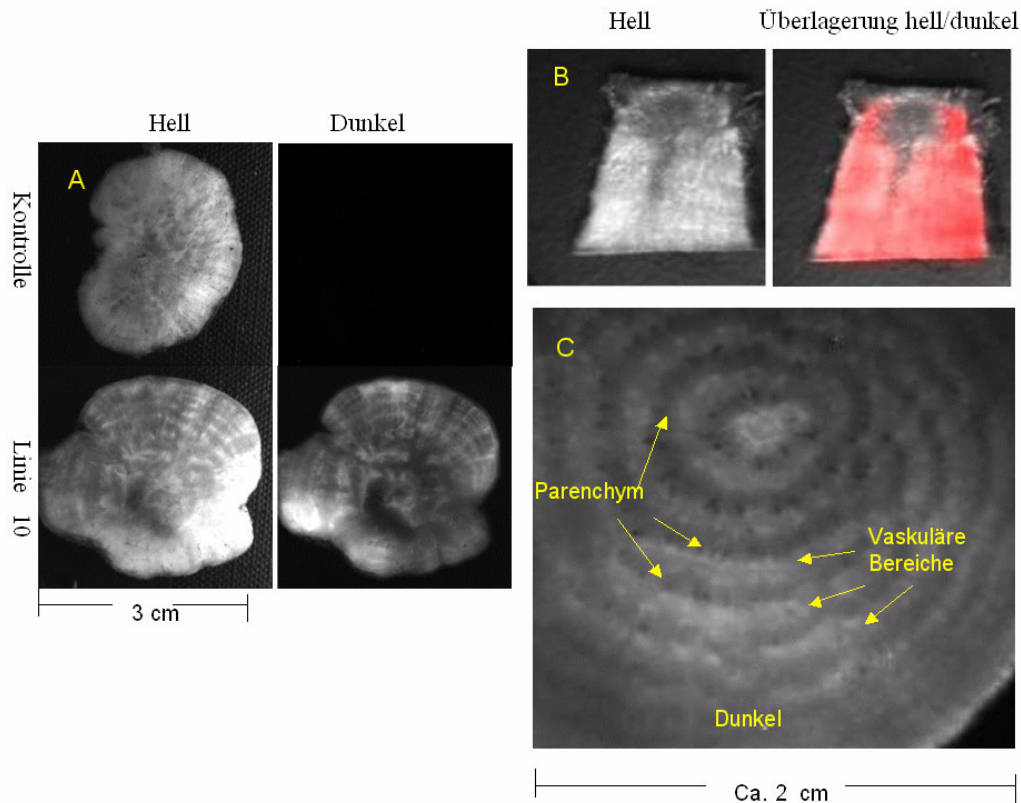


Abb. 9: Expressionsprofil des BvMII Promotors in der Wurzel der Zuckerrübe. Histochemische Luciferase-Assays wurden mit Wurzelquer- und längsschnitten 3 bzw. 6 Monate alter Zuckerrüben durchgeführt, die ein BvMII Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. **A.** Wurzelquerschnitt einer 3 Monate alten Zuckerrübe von Linie 10 sowie von einer nichttransgenen Kontrolle (Hell- bzw. Dunkelaufnahme) **B.** Längsschnitt von einer oberen Hälfte 3 Monate alter Zuckerrüben, Linie 10. **C.** Ausschnitt eines 6 Monate alten Wurzelscheibenquerschnitts, Linie 9. Der BvMII Promotor vermittelt Aktivität über den ganzen Querschnitt der Wurzel der Zuckerrübe. Die nichttransgene Linie zeigt keine Lichtemission.

3.1.1.4 Der Promotor von BvSmp vermittelt in der Zuckerrübe kein einheitliches Expressionsprofil

Für die quantitative Bestimmung der Luciferase-Aktivität des BvSmp Promotor-Reportergenkonstruktes (36-LUC-pGPTV-Bar, Tab. 8) wurden 17 voneinander unabhängige Linien untersucht. 10 dieser 17 Linien vermitteln eine Luciferase-Aktivität, die höher als der unspezifische Hintergrund ist. Abb. 10 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Luciferase-Assays für diese 10 Linien. Das Expressionsprofil des BvSmp Promotors ist nicht einheitlich. Drei von zehn Linien exprimieren die Luciferase im Blatt und kaum in der Wurzel (Linien 7,8

und 9). Sechs Linien weisen hingegen eine wurzelspezifische Promotoraktivität auf. Die Blatt-Expression der Luciferase ist für diese sechs Linien gering. In der Wurzel wurden bis zu mehr als zweihundertfünzigfach höhere Werte als im Blatt gemessen (Linie 13 jung, Linie 19, Abb. 10). Linie 26 weist in der Wurzel nur eine leicht höhere Promotoraktivität als im Blatt auf.

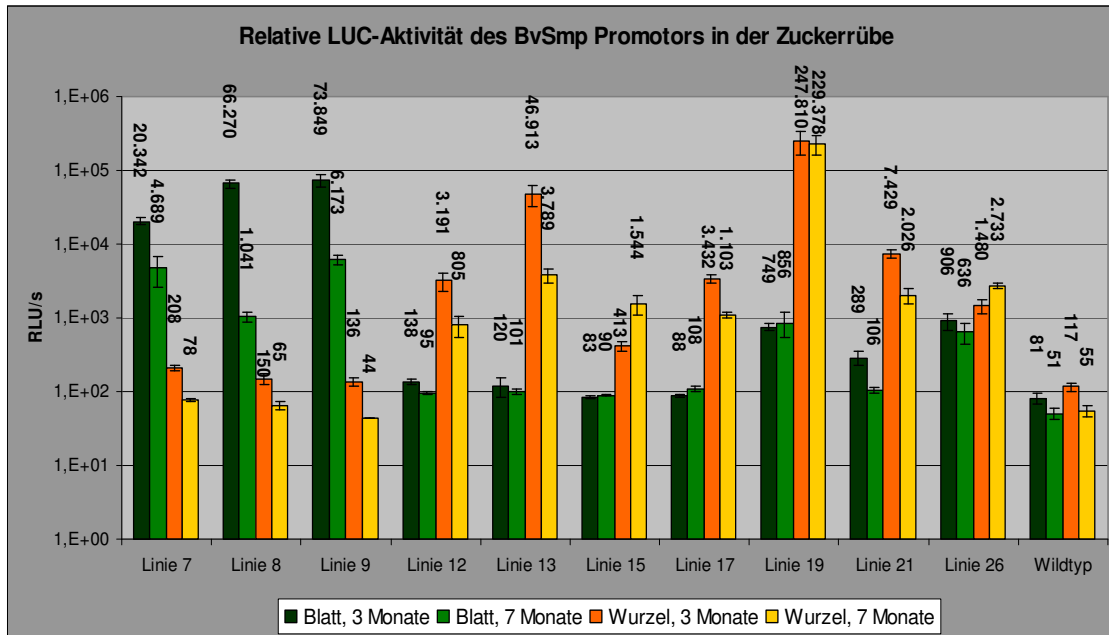


Abb. 10: Quantitative Luciferase-Analyse des BvSmp Promotor-Reportergergenkonstruktes in der Zuckerrübe. Dargestellt sind die gemessenen quantitativen Luciferase-Werte für 10 voneinander unabhängige transgene Linien, die ein Promotor-Reportergergenkonstrukt für BvSmp tragen, sowie als Kontrolle für eine Wildtyplinie. Wurzel- und Blattgewebe ca. 3 bzw. ca. 8 Monate alter Pflanzen wurde analysiert. Die Auftragung der gemessenen Werte ist logarithmisch. Der Promotor vermittelt kein einheitliches Expressionsprofil in der Zuckerrübe. Drei Linien zeigen ein blattspezifisches Expressionsverhalten, sechs der übrigen ein wurzelspezifisches.

Zur Bestimmung des Expressionsprofils des BvSmp Promotors in der Wurzel wurden histochemische Assays für die Linien 13 und 19 durchgeführt. Linie 19 weist von den untersuchten Linien, die ein Promotor-Reportergergenkonstrukt für BvSmp tragen, quantitativ mit Abstand die höchste Reportergergenexpression auf.

Abb. 11 stellt die Ergebnisse der histochemischen Analyse von Wurzellängs- und Querschnitten der Linien 13 und 19 dar. Als Vergleich wurde ein Zuckerrübenquerschnitt des Wildtyps analysiert (Abb. 11a). Der BvSmp Promotor ist vermutlich in den vaskulären Bereichen der Zuckerrübenwurzel aktiv. Die Expression der Luciferase ist punktuell und erstreckt sich ringförmig um das zentrale Xylem (Abb. 11c und d).

Zum Zeitpunkt der qualitativen Analyse für den BvSmp Promotor stand noch kein geeigneter Adapter für das Stereomikroskop zur Verfügung. Deshalb konnten keine

Vergrößerungsaufnahmen von Wurzelquerschnitten angefertigt werden und es war keine eindeutige Zuordnung der Reportergenexpression auf ein bestimmtes Gewebe möglich. Jedoch deutet die ringförmig angeordnete punktuelle Expression darauf hin, dass die Expression der Luciferase mit der Lage der einzelnen Leitgefäße der vaskulären Bereiche assoziiert ist. Vermutlich ist der BvSmp Promotor wie die Promotoren von BvHis1-r und BvTlp1 in der Rübe im Begleitgewebe des Xylems aktiv.

Die beiden histochemisch untersuchten Linien 13 und 19 unterscheiden sich hinsichtlich ihres Expressionsprofils in Zuckerrübenwurzeln leicht. Beide Linien zeigen die oben beschriebene ringförmig-punktuelle Expression, jedoch wird in der Linie 19 sowohl im Längs- als auch im Querschnitt eine sehr starke Expression der Luciferase im Bereich des Zentralxylems beobachtet (Abb. 11a, b und d). Weiterhin ist in Linie 19 der Promotor am Rand des Wurzelquerschnittes aktiv, während in Linie 13 das Reportergen in diesem Bereich nicht exprimiert wird (11c).

Drei von zehn untersuchten Linien mit einem Promotor-Luciferase-Konstrukt für BvSmp exprimieren die Luciferase stärker im Blatt der Zuckerrübe als in der Wurzel, in den übrigen sieben ist die Luciferaseexpression wurzelspezifisch. Histochemische Analysen von zwei der sieben wurzelspezifischen Linien zeigen, dass der Promotor vermutlich in den vaskulären Bereichen der Rübe im Begleitgewebe des Xylems aktiv ist.

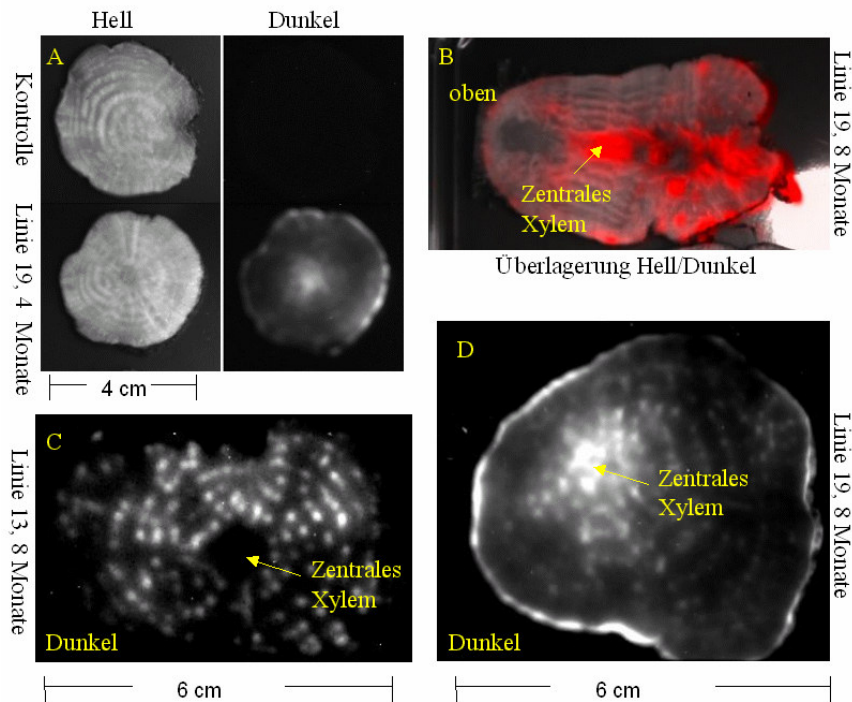


Abb. 11: Expressionsprofil des BvSmp Promotors in der Wurzel der Zuckerrübe. Histochemische Luciferase-Assays wurden von Wurzelquer- und längsschnitten 4 bzw. 8 Monate alter Zuckerrüben durchgeführt, die ein BvSmp Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. **A.** Wurzelquerschnitt einer 4 Monate alten Zuckerrübe von Linie 19 sowie von einer nichttransgenen Kontrolle (Hell- bzw. Dunkelaufnahme) **B.** Wurzellängsschnitt, Linie 19, ca. 8 Monate, Überlagerung der Hell- und Dunkelaufnahme, gekennzeichnet ist das Zentralxylem sowie der Bereich, der aus dem Hypokotyl des Keimlings hervorgeht. **C.** Querschnitt einer 7 Monate alten Wurzelscheibe, Linie 13. **D.** Querschnitt einer 8 Monate alten Wurzelscheibe, Linie 19. Der Promotor vermittelt Aktivität in den vaskulären Bereichen der Zuckerrübenwurzel. In Linie 19, die das Reportergen mit Abstand am stärksten exprimiert, wird Reportergenaktivität auch im Bereich des Zentralxylems nachgewiesen. In Linie 13 wird in diesem Bereich keine Reportergenaktivität beobachtet. Die nichttransgene Linie zeigt keine Lichtemission.

3.1.1.5 Das Expressionsprofil von BvTlp2 in den untersuchten transgenen Zuckerrüben ist nicht einheitlich

Für die quantitative Analyse der Luciferaseaktivität des Promotor-Reportergenkonstruktes von BvTlp2 (LWF05-LUC-pGPTV-Bar, Tab. 8) wurden 12 voneinander unabhängige Linien untersucht. 9 der 12 Linien zeigen Aktivitäten, die oberhalb des unspezifischen Hintergrundes liegen.

Abb. 12 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Luciferase-Assays für diese 9 Linien. Der Promotor von BvTlp2 weist weder für junge noch für alte Pflanzen ein einheitliches Profil auf. Vier Linien exprimieren das Reportergen in der Wurzel stärker als im Blatt, für vier weitere Linien verhält es sich umgekehrt. Weiterhin zeigt mit Ausnahme von Linie 1 jede Linie im

jungen und alten Stadium das gleiche Expressionsprofil. Das heißt, dass Linien, die im jungen Stadium das Reporter-gen blattspezifisch exprimieren, auch im alten Stadium eine blattspezifische Expression vermitteln. Da der Promotor in der Zuckerrübe ein sehr uneinheitliches Expressionsprofil vermittelt, wurden für Pflanzen mit dem BvTlp2 Promotor-Reporter-genkonstrukt keine histochemischen LUC-Assays durchgeführt.

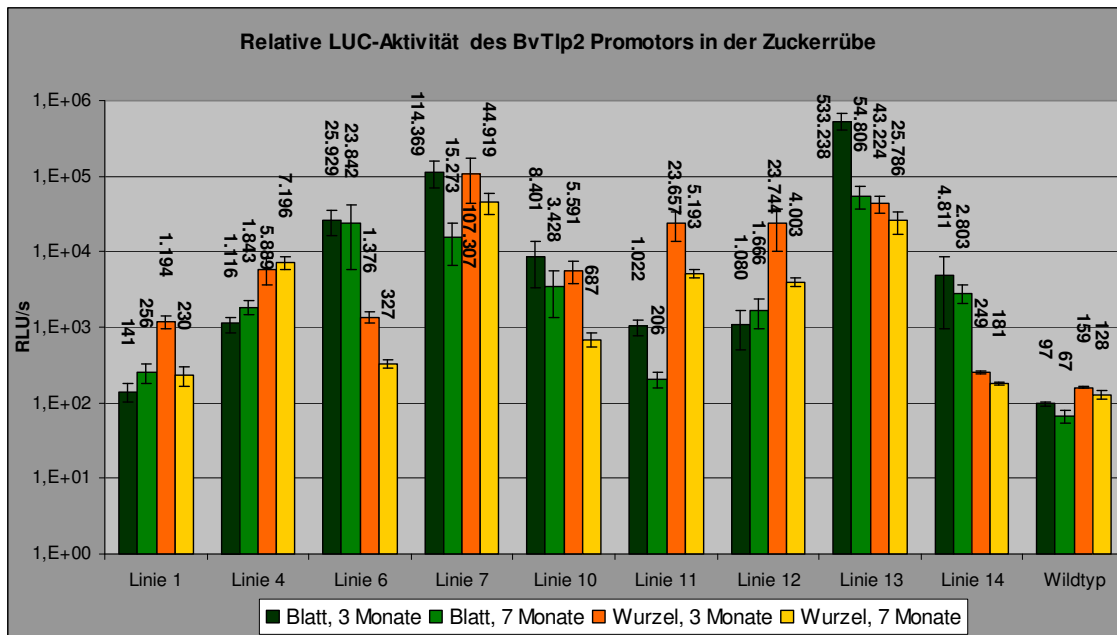


Abb. 12: Quantitative Luciferase-Analyse für das BvTlp2 Promotor-Luciferasekonstrukt in der Zuckerrübe. Die Abbildung zeigt die quantitativen Luciferase-Werte für 9 voneinander unabhängige transgene Linien, die ein Promotor-Reporter-genkonstrukt für BvTlp2 tragen, sowie als Kontrolle für eine Wildtyplinie. Wurzel- und Blattgewebe ca. 3 bzw. ca. 7 Monate alter Pflanzen wurde analysiert. Die Auftragung der gemessenen Werte ist logarithmisch. Der Promotor vermittelt in der Zuckerrübe kein einheitliches Expressionsprofil.

3.1.2 Expressionsanalyse der fünf wurzelspezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe in Tabak

Für die Expressionsanalyse der fünf Zuckerrüben-Promotoren im heterologen System Tabak wurden die einzelnen Promotoren mit der β -Glucuronidase aus *E. coli* fusioniert (Tab. 7) und mittels Blattscheibentransformation stabil in Tabak transformiert. Qualitative und quantitative β -Glucuronidase-Assays wurden mit der ersten transgenen Nachfolgegengeneration zur Analyse der Expressionsprofile der fünf Promotoren durchgeführt. Für die quantitative Analyse wurde die β -Glucuronidase-Aktivität von Wurzel-, Hypokotyl- und Blattgewebe ca. 14 Tage alter Tabakkeimlinge bestimmt. Die GUS-Aktivität einer CaMV 35S GUS-Linie wurde bestimmt, um Aussagen über die Stärke der Aktivität der einzelnen Zuckerrüben-Promotoren machen zu können. Für die Lokalisierung der Reporterogenaktivität wurden histochemische GUS-Assays von 6, 14, 22 und 35 Tage alten Tabakkeimlingen durchgeführt. Als Vergleich wurde eine 35S GUS-Tabaklinie untersucht. Alle untersuchten Tabakpflanzen wurden auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose kultiviert.

3.1.2.1 Der BvSmp Promotor ist in Tabak spezifisch in der Wurzel und im Hypokotyl aktiv

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität des Promotor-GUS-Konstruktes von BvSmp (36-GUS-pOCA28, Tab. 7) in Tabak wurden sechs voneinander unabhängige Linien analysiert. Die Expressionsprofile der untersuchten Linien sind jeweils einheitlich (siehe Anhang). Deshalb wurden die Ergebnisse der quantitativen Analyse für jedes Gewebe zu jeweils einem Wert zusammengefasst.

Abb. 13 zeigt die zusammengefassten Werte für die GUS-Aktivitäten von Blatt, Wurzel und Hypokotyl von 14 Tage alten Tabakkeimlingen der sechs untersuchten Linien. Der Promotor von BvSmp vermittelt in Tabak eine gewebespezifische Expression. Er ist in der Wurzel und im Hypokotyl aktiv. Die Höhe der Reporterogenaktivität in diesen beiden Geweben ist miteinander vergleichbar. Im Blatt ist quantitativ kaum Aktivität nachweisbar; die gemessene Aktivität ist 40x geringer als in der Wurzel und ist mit einem Wert von ca. 23 pmol 4-MU/(min x mg) nicht signifikant höher als der Hintergrund in der nichttransgenen Kontrolle (5 pmol 4-MU/(min x mg)). Abb. 14 zeigt einen Vergleich der quantitativen GUS-Aktivität des BvSmp Promotors mit der des CaMV 35S Promotors und der vier anderen Zuckerrübenpromotoren in Tabak. Der Vergleich zeigt, dass der Promotor von BvSmp in Tabak verglichen mit dem CaMV 35S Promotor nur schwach aktiv ist. In der Wurzel hat er nur ca. 3 % der Aktivität des CaMV 35S Promotors (Abb. 14).

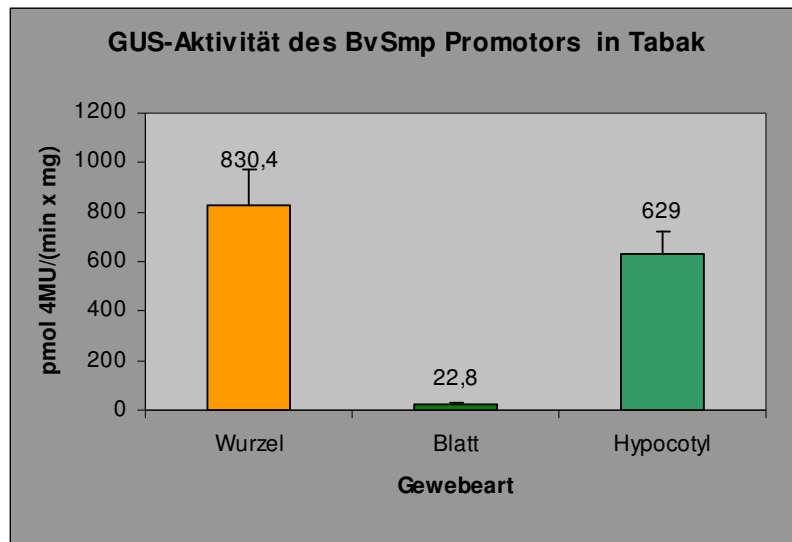


Abb. 13: Quantitative β -Glucuronidase-Analyse für das BvSmp Promotor-Repotergenkonstrukt in Tabak. Die Abbildung fasst die quantitativen β -Glucuronidase-Werte für 6 voneinander unabhängige transgene Linien zusammen, die ein Promotor-Reportergenkonstrukt für den BvSmp Promotor tragen. Die GUS-Aktivität von Wurzel, Blatt und Hypocotyl wurde von ca. 14 Tage alten Tabakkeimlingen bestimmt. Der Promotor wird in Tabak spezifisch in der Wurzel und im Hypocotyl exprimiert und ist im Blatt nur schwach aktiv.

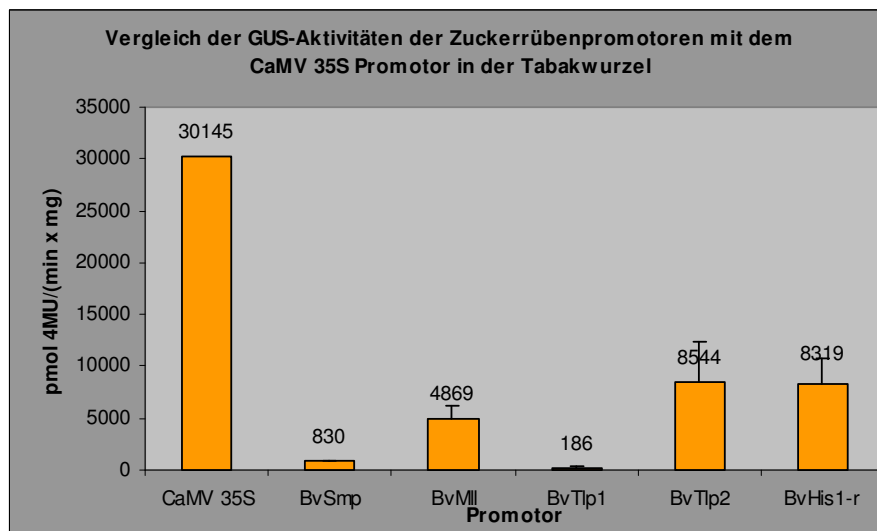


Abb. 14: Vergleich der Wurzel- β -Glucuronidaseaktivitäten der 5 Zuckerrübenpromotoren mit dem CaMV 35S Promotor. Analysiert wurde Wurzelgewebe von jeweils 14 Tage alten Tabakkeimlingen, die die angegebenen Promotor-GUS-Konstrukte tragen. Die untersuchten Promotoren sind in der Wurzel unterschiedlich stark aktiv.

Um einen Eindruck von der Gewebespezifität und der entwicklungsabhängigen Reportergenexpression des BvSmp Promotors zu bekommen, wurden histochemische β -

Glucuronidase-Assays mit drei voneinander unabhängigen Linien durchgeführt (Linien 2,4,5). Diese Linien weisen übereinstimmende Expressionsprofile auf (nicht gezeigt).

Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der histochemischen Analyse für unterschiedliche Zeitpunkte der Entwicklung von Linie 5. Linie 5 vermittelt im Falle der BvSmp Promotor-GUS-Pflanzen die höchste Reporterogenaktivität (siehe Anhang). Die histochemischen Analysen korrelieren mit den quantitativen Analysen. Der Promotor ist spezifisch im Blatt und Hypokotyl von Tabak aktiv. Jedoch wurde eine leichte Blaufärbung des Blattrandes bei 14, 22 und 36 Tage alten Keimlingen beobachtet (Abb. 15a). In sechs Tage alten Keimlingen ist in keinem Gewebe eine GUS-Aktivität nachweisbar (Abb. 15a, 6d). Vergrößerungen GUS-gefärbter Wurzeln 22 Tage alter Pflanzen zeigen, dass der Promotor im Zentralzylinder der Wurzel aktiv ist, aber nicht im Rindengewebe (Abb. 15b).

Der BvSmp Promotor ist verglichen mit dem CaMV 35S Promotor in Tabak nur schwach aktiv, jedoch vermittelt er eine spezifische Expression in der Wurzel und im Hypokotyl. Im Blatt wurde im Vergleich zum Wildtyp quantitativ keine Reporterexpression nachgewiesen.

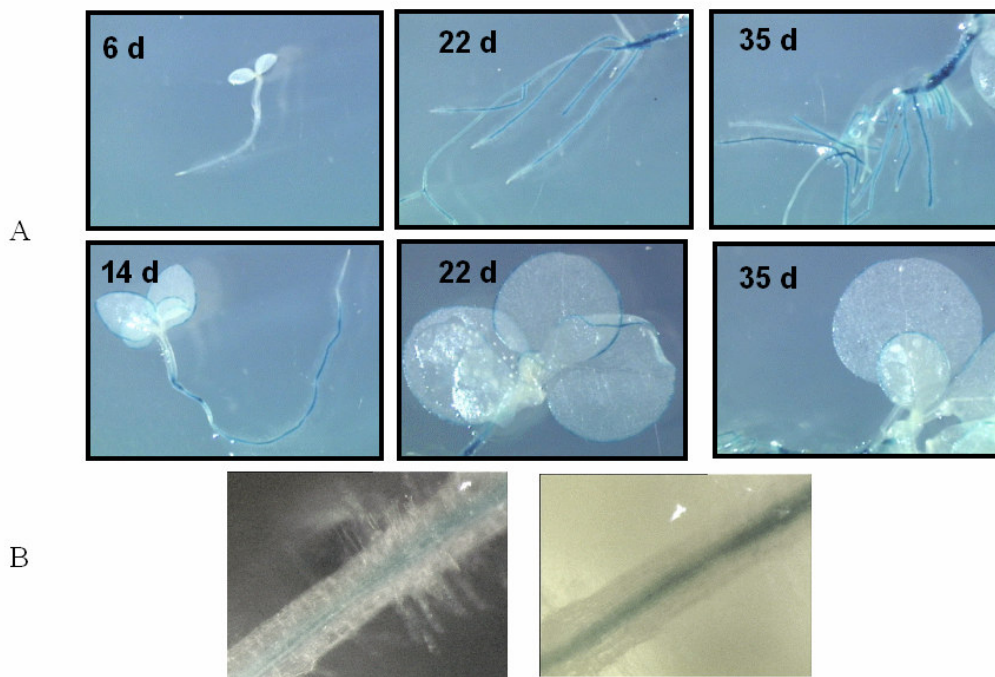


Abb. 15: Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität des BvSmp Promotor-Reporterkonstruktes in transgenen Tabakkeimlingen unterschiedlichen Alters. Histochemische GUS-Assays wurden mit 6, 14, 22 und 35 Tage alten Tabakkeimlingen durchgeführt, die ein BvSmp Promotor-GUS-Konstrukt enthalten. **A.** Nachweis der Reporterogenaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. **B.** Reporterexpression in der Wurzel. Der Promotor wird spezifisch im Hypokotyl und der Wurzel sowie im Bereich des Blattrandes exprimiert. In der Wurzel ist der Promotor im Zentralzylinder aktiv.

3.1.2.2 Der BvMII Promotor vermittelt in Tabak eine gewebespezifische Expression und ist in der Wurzel, im Hypokotyl sowie im Leitgewebe des Blattes aktiv

Für die quantitative Analyse der Aktivität des BvMII Promotor-GUS-Konstruktes (48-GUS-pOCA28, Tab. 7) wurde die GUS-Aktivität von 8 voneinander unabhängigen Linien bestimmt. Abb. 16 zeigt die Ergebnisse der quantitativen GUS-Assays. Der BvMII Promotor vermittelt eine gewebespezifische Expression und ist in der Wurzel und im Hypokotyl aktiv. Im Blatt ist quantitativ eine schwächere Aktivität nachweisbar. Die Aktivität in der Wurzel ist doppelt so hoch wie im Hypokotyl und ca. 40fach so hoch wie im Blatt. Die Aktivität des Promotors beträgt in der Wurzel ca. 16 % der Aktivität des CaMV 35S Promotors (Abb. 14).

Für die Analyse des histochemischen Expressionsprofils wurden drei voneinander unabhängige Linien untersucht (Linien 5, 10, 11). Diese zeigen übereinstimmende Expressionsprofile (nicht gezeigt). Abb. 17 zeigt histochemische Assays für Linie 11, eine Linie mit mittlerer GUS-Aktivität. Im histochemischen Assay zeigen Wurzeln und Hypokotyl eine starke Blaufärbung. In Blättern sind vor allem die Leitbündel angefärbt. (Abb. 17a, 22d und 35d, Blatt). Vergrößerungen GUS gefärbter Wurzeln zeigen, dass der Promotor fast im gesamten Wurzelgewebe aktiv ist (Abb. 17b). Die Aktivität des BvMII Promotors ist im Zentralzylinder verglichen mit dem Rindengewebe der Wurzel scheinbar stärker. In den Wurzelhaaren ist keine Reportergenaktivität nachweisbar.

Der Promotor von BvMII vermittelt im quantitativen Assays eine spezifische Expression in der Wurzel und im Hypokotyl von Tabak. Im Blatt ist er im Leitgewebe aktiv.

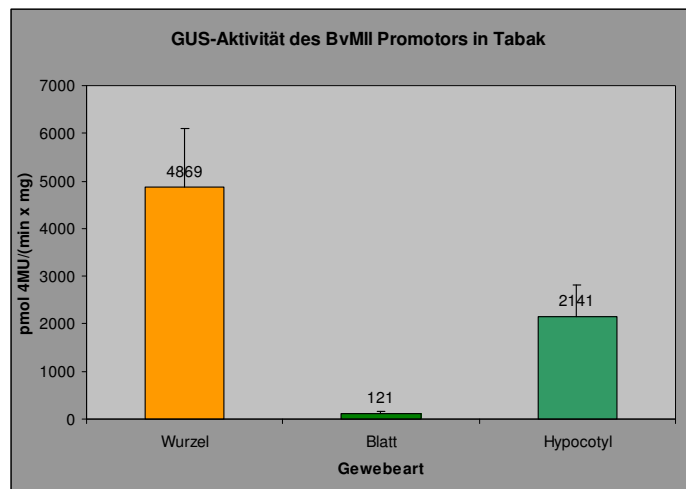


Abb. 16: Quantitative β -Glucuronidase-Analyse für das BvMII Promotor-Reportergenkonstrukt in Tabak. Die Abbildung fasst die quantitativen β -Glucuronidase-Werte für 8 voneinander unabhängige transgene Linien zusammen, die ein BvMII Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. Es wurde die GUS-Aktivität von Wurzel, Blatt und Hypocotyl von ca. 14 Tage alten Tabakkeimlingen bestimmt. Der Promotor wird in Tabak gewebespezifisch exprimiert. Er ist in der Wurzel und im Hypocotyl aktiv, im Blatt wird eine geringe GUS-Aktivität nachgewiesen.

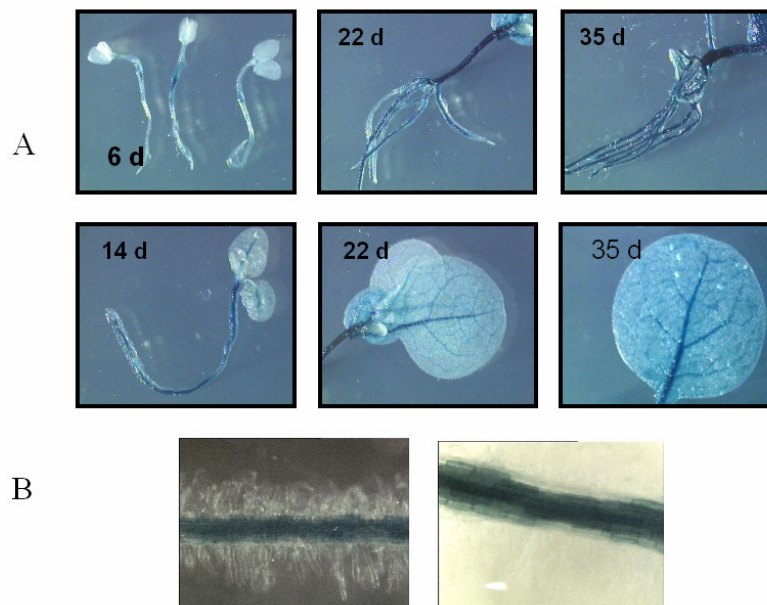


Abb. 17: Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität des BvMII Promotor-Reportergenkonstruktes in transgenen Tabakkeimlingen unterschiedlichen Alters. Histochemische GUS-Assays wurden mit 6, 14, 22 und 35 Tage alten Tabakkeimlingen durchgeführt, die ein BvMII Promotor-GUS-Konstrukt enthalten. **A.** Nachweis der Reportergenaktivität in einzelnen Zeitpunkten der Entwicklung. **B.** Reportergenexpression in der Wurzel. Der Promotor ist in der Wurzel, im Hypocotyl sowie im Leitgewebe des Blattes aktiv. In der Wurzel vermittelt der Promotor mit Ausnahme der Wurzelhaare sowie vermutlich der Wurzelepidermis Aktivität in allen untersuchten Geweben.

3.1.2.3 Der BvTlp1 Promotor vermittelt in Tabak eine gewebespezifische Expression, ist aber nur schwach aktiv

Für die Bestimmung der quantitativen β -GUS-Aktivität des BvTlp1 Promotor-GUS-Konstruktes (88-GUS-pOCA28, Tab. 7) in Tabak wurden vier voneinander unabhängige Linien analysiert. Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der quantitativen GUS-Assays für 14 Tage alte Tabakkeimlinge.

BvTlp1 zeigt von den untersuchten Promotoren die schwächste Reportergenexpression in Tabak. Die GUS-Aktivität in der Wurzel beträgt weniger als 1 % der GUS-Aktivität des CaMV 35S Promotors (Abb. 14). Jedoch wird auch für BvTlp1 wie für die Promotoren von BvSmp und BvMll eine spezifische Expression sowohl in der Wurzel als auch im Hypokotyl beobachtet (Abb. 18). Die Aktivität des Promotors ist in der Wurzel viermal höher als im Hypokotyl und ca. 40 mal höher als im Blatt, wo GUS-Werte gemessen wurden, die nur schwach oberhalb des nichttransgenen Hintergrundes liegen.

Für die Analyse des histochemischen Expressionsprofils wurden zwei voneinander unabhängige Linien untersucht (Linien 6 und 3). Diese zeigen übereinstimmende histochemische Expressionsprofile (nicht gezeigt). Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der histochemischen Analyse für unterschiedliche Zeitpunkte der Entwicklung von Linie 6. Linie 6 vermittelt von den BvTlp1 Promotor-GUS-Pflanzen die höchste Reportergenaktivität (siehe Anhang). Die gemessene schwache Expression für 14 Tage alte Keimlinge (Abb. 18) korreliert sehr gut mit der histochemisch kaum nachweisbaren GUS-Expression für Keimlinge gleichen Alters (Abb. 19a, 14d). Erst bei 22 bzw. 35 Tagen alten Keimlingen wird die Blaufärbung in der Wurzel bzw. im Hypokotyl besser sichtbar (Abb. 19a, 22d und 35d). Die Vergrößerung von Wurzeln 22 Tage alter Keimlinge zeigt, dass das GUS-Gen in der Tabakwurzel im Zentralzylinder exprimiert wird. In den anderen Geweben der Wurzel ist keine GUS-Aktivität nachweisbar (Abb. 19b).

Der BvTlp1 Promotor ist in Tabak nur sehr schwach aktiv, vermittelt aber eine spezifische Expression im Hypokotyl und in der Wurzel.

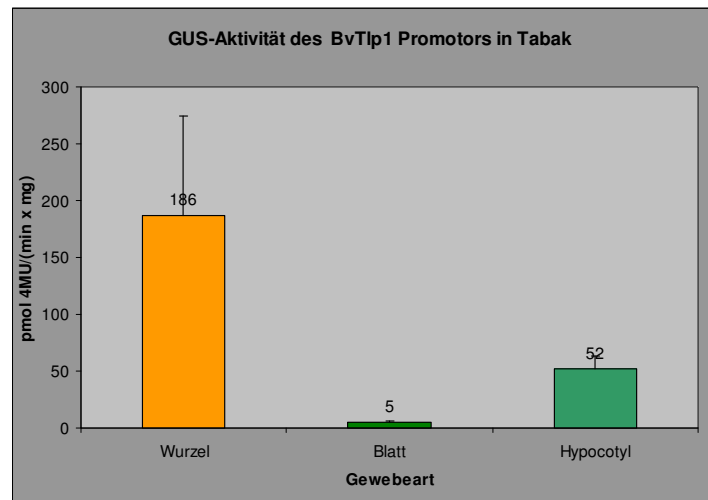


Abb. 18: Quantitative β -Glucuronidase-Analyse des BvTlp1 Promotor-GUS-Konstruktes in Tabak. Die Abbildung fasst die quantitativen β -Glucuronidase-Werte für 4 voneinander unabhängige transgene Linien zusammen, die ein BvTlp1 Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. Es wurde die GUS-Aktivität von Wurzel, Blatt und Hypocotyl von ca. 14 Tage alten Tabakkeimlingen bestimmt. Der Promotor ist in Tabak nur schwach aktiv, vermittelt aber eine gewebespezifische Expression des Reportergens in Tabak. Er ist in Tabak in der Wurzel und im Hypocotyl aktiv; im Blatt wird kaum GUS-Aktivität nachgewiesen.

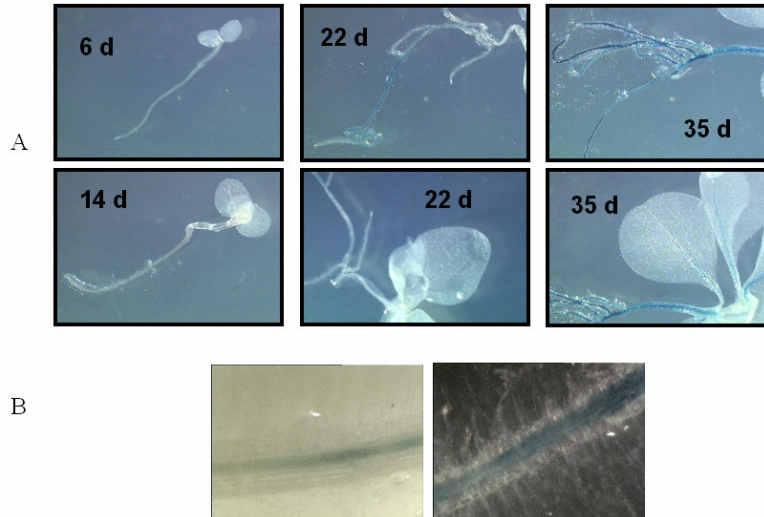


Abb. 19: Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität des BvTlp1 Promotors in transgenen Tabakkeimlingen unterschiedlichen Alters. Histochemische GUS-Assays wurden mit 6, 14, 22 und 35 Tage alten Tabakkeimlingen durchgeführt, die ein BvTlp1 Promotor-GUS-Konstrukt enthalten. **A.** Nachweis der Reportergenaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. **B.** Reportergenexpression in der Wurzel. Der Promotor vermittelt eine spezifische Expression des Reportergens in Tabak. Für den Promotor von BvTlp1 wird für 22 und 35 Tage alte Keimlinge eine Reportergenaktivität in der Wurzel und im Hypocotyl (35d) nachgewiesen, kaum jedoch im Blatt. In der Wurzel ist der Promotor im Zentralzylinder aktiv.

3.1.2.4 Der BvTlp2 Promotor ist in der Epidermis der Tabakwurzel sowie in den Wurzelhaaren aktiv

Für die quantitative Analyse der GUS-Aktivität ca. 14 Tage alter Tabakkeimlinge mit einem Promotor-Reportergenkonstrukt für BvTlp2 (LWF05-GUS-pOCA28, Tab. 7) wurden 6 voneinander unabhängige transgene Linien untersucht. Abb. 20 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse. Der BvTlp2 Promotor vermittelt in der Wurzel fast 30 % der Aktivität des CaMV 35S Promotors und zeigt damit in der Wurzel die stärkste Reportergenexpression der 5 untersuchten Promotoren in Tabak (Abb. 14). Weiterhin ist der Promotor verglichen mit den vier anderen Promotoren für das Wurzelgewebe am spezifischsten. Der Promotor ist in 14 Tagen alten Keimlingen in der Wurzel ca. 200x aktiver als im Blatt und ca. 40x aktiver als im Hypokotyl (Abb. 20). Im Blatt ist quantitativ nur eine geringe Reportergenaktivität nachweisbar.

Für die Untersuchung der qualitativen GUS-Aktivität wurden drei voneinander unabhängige Linien eingesetzt (Linien 1, 2, 3). Diese weisen vergleichbare histochemische Expressionsprofile auf (nicht gezeigt). Abb. 21 zeigt die Ergebnisse der histochemischen GUS-Analyse für eine Linie mit mittlerer Expression (Linie 3). Histochemisch konnte die in den quantitativen GUS-Assays gezeigte Spezifität des Promotors verifiziert werden. Der Promotor ist spezifisch in der Wurzel aktiv (z. B. Abb 21a, 14d und 35d). Allerdings ist an einigen Stellen im Blatt, aber auch im Hypokotyl eine Expression nachweisbar (Abb. 21a, 35d). Die Ursache dafür könnte eine Verwundungsinduktion sein, da der Keimling mit der Pinzette aus dem Medium gezogen wurde. In sechs Tage alten Keimlingen ist histochemisch in keinem Gewebe GUS-Aktivität nachweisbar (Abb. 21a, 6d). Die Vergrößerung einer GUS-gefärbten Wurzel zeigt, dass der BvTlp2 Promotor nicht der gesamten Wurzel aktiv ist, sondern scheinbar nur in der Epidermis der Tabakwurzel und den Wurzelhaaren (Abb. 21b). Der BvTlp2 Promotor vermittelt von den fünf untersuchten Promotoren in Tabak das spezifischste Expressionsprofil. Er wird sehr stark in den Wurzelhaaren und der Epidermis der Wurzel exprimiert, jedoch kaum im Hypokotyl und im Blattgewebe.

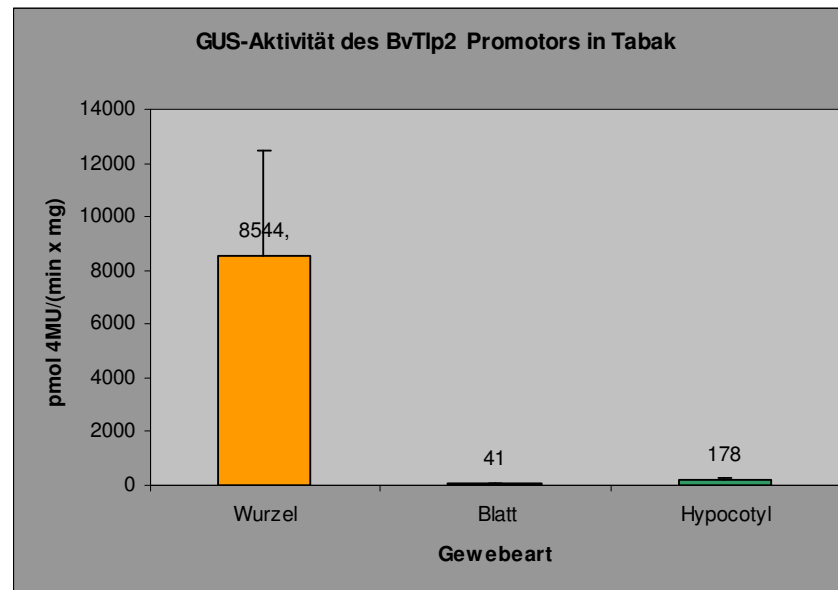


Abb. 20: Quantitative β -Glucuronidase-Analyse für das BvTlp2 Promotor-GUS-Konstrukt in Tabak. Dargestellt ist eine Zusammenfassung der quantitativen β -Glucuronidase-Werte für 6 voneinander unabhängige transgene Linien, die ein BvTlp2 Promotor-Reporterergenkonstrukt tragen. Es wurde die GUS-Aktivität von Wurzel, Blatt und Hypocotyl von ca. 14 Tage alten Tabakkeimlingen bestimmt. Der Promotor ist in Tabak sehr spezifisch in der Wurzel aktiv. Er vermittelt eine hohe Reporterergenaktivität fast ausschließlich in der Wurzel. Im Hypocotyl und im Blatt wird das Reporterergen kaum exprimiert.

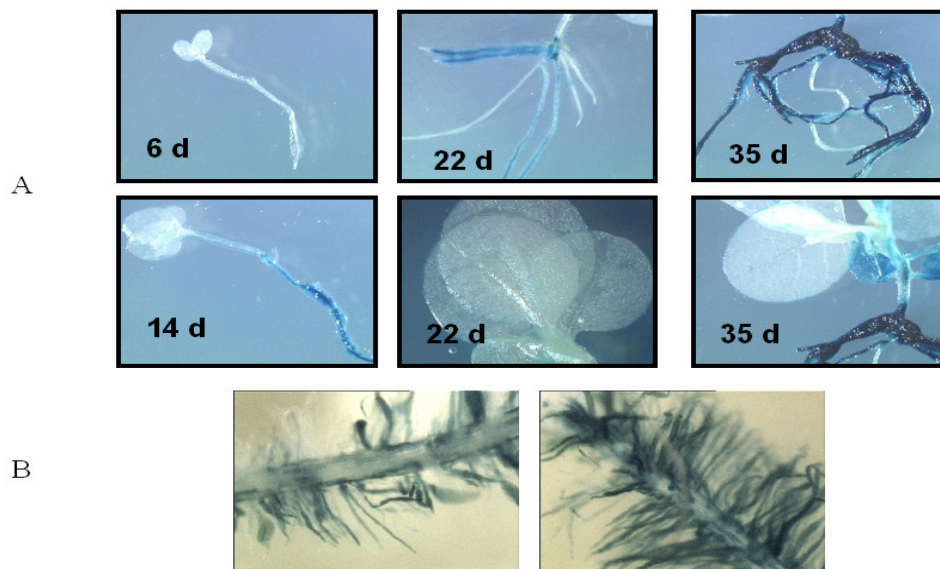


Abb. 21: Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität des BvTlp2 Promotors in transgenen Tabakkeimlingen unterschiedlichen Alters. Histochemische GUS-Assays wurden mit 6, 14, 22 und 35 Tage alten Tabakkeimlingen durchgeführt, die ein BvTlp2 Promotor-GUS-Konstrukt enthalten. **A.** Nachweis der Reporterergenaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. **B.** Reporterergenexpression in der Wurzel. Der Promotor wird in Tabak gewebespezifisch in den Wurzelhaaren und der Wurzelepidermis exprimiert.

3.1.2.5 Der BvHis1-r Promotor vermittelt Reportergenexpression in Blatt, Wurzel und Hypokotyl

Für die quantitative Bestimmung der Reportergenexpression des BvHis1-r Promotor-GUS-Konstruktes in Tabak (47-GUS-pOCA28, Tab. 7) wurden fünf voneinander unabhängige Linien eingesetzt. Abb. 22 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse.

Das Promotor-Reportergenkonstrukt von His1-r zeigt in der Wurzel eine relativ hohe Expressionsstärke von ungefähr 28% der Stärke des CaMV 35S Promotors (Abb. 14). Allerdings weist der Promotor in Tabak keine Gewebespezifität auf. Die GUS-Aktivitäten in Blatt, Wurzel und Hypokotyl sind sehr hoch und miteinander vergleichbar (Abb. 22).

Drei voneinander unabhängige Linien wurden im Rahmen der quantitativen Analysen untersucht und weisen in den histochemischen Assays vergleichbare Expressionsprofile auf (Linien 3, 7, 9; nicht gezeigt). Abb. 23 zeigt das Ergebnis der histochemischen Analyse für Linie 9. Die Ergebnisse der histochemischen Analyse stimmen mit den quantitativen Ergebnissen überein (Abb. 22). Das Promotor-GUS-Konstrukt von BvHis1-r vermittelt sowohl in Blättern, in der Wurzel als auch im Hypokotyl eine starke Blaufärbung (Abb. 23a, z.B. 14d). In der Wurzel ist der Promotor mit Ausnahme der Wurzelhaare vermutlich im gesamten Organ aktiv (Abb. 23 b).

Der BvHis1-r Promotor vermittelt eine hohe Reportergenexpression in Tabak, zeigt aber keine Gewebespezifität.

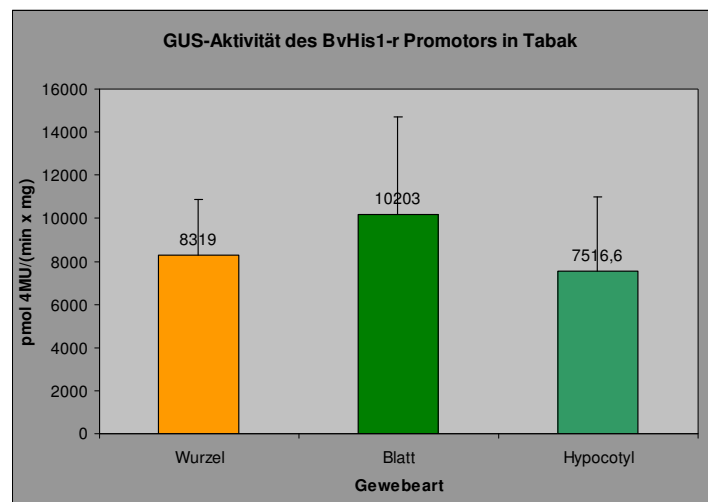


Abb. 22: Quantitative β -Glucuronidase-Analyse für das BvHis1-r Promotor-Reportergenkonstrukt in Tabak. Die Abbildung fasst die quantitativen β -Glucuronidase-Werte für 5 voneinander unabhängige transgene Linien zusammen, die ein BvHis1-r Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. Es wurde die GUS-Aktivität von Wurzel, Blatt und Hypokotyl von ca. 14 Tage alten Tabakkeimlingen bestimmt. Der Promotor wird in allen Geweben stark exprimiert.

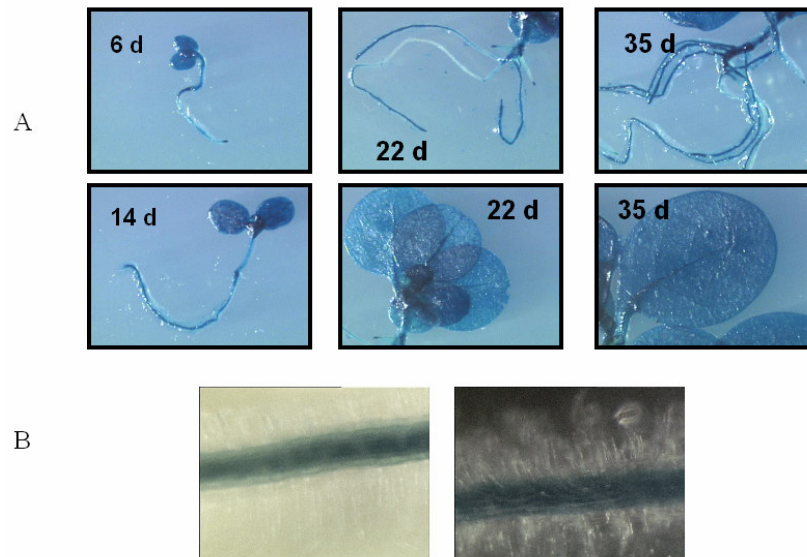


Abb. 23: Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität des BvHis1-r Promotors in transgenen Tabakkeimlingen unterschiedlichen Alters. Histochemische GUS-Assays wurden mit 6, 14, 22 und 35 Tage alten Tabakkeimlingen durchgeführt, die ein BvHis1-r Promotor-GUS-Konstrukt enthalten. **A.** Nachweis der Reportergenaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. **B.** Reportergenexpression in der Wurzel. Der Promotor von BvHis1-r ist in Tabak in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme der Wurzelhaare aktiv.

3.2 Expressionsprofil der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana*

3.2.1 Die Linker-Histone von *Arabidopsis thaliana* werden nahezu ubiquitär exprimiert, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Expressionsstärke in den unterschiedlichen Geweben

Es wurde untersucht, welches Expressionsprofil die Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* zeigen. Dazu wurden die putativen Promotorbereiche 5' des Translationsstartpunktes der jeweiligen Gene mit dem promotorlosen β -Glucuronidasegen aus *E. coli* fusioniert (Konstrukte in Tab. 10). Die einzelnen Konstrukte wurden mittels Floral-Dip in *Arabidopsis thaliana* transformiert.

Über eine Segregationsanalyse der ersten transgenen Nachfolgegeneration wurden Linien mit nur einem T-DNA-Locus identifiziert (nicht gezeigt). Diese wurden anschließend für die Bestimmung des Expressionsprofils der drei Linker-Histone eingesetzt. Dazu wurden qualitative und quantitative β -Glucuronidase-Assays für unterschiedliche Gewebe bzw. in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung durchgeführt.

Im Rahmen der histochemischen Analyse wurden folgende Gewebe/Stadien untersucht: 6 bzw. 18 Tage alte Pflanzen, Blätter ca. fünf Wochen alter Pflanzen sowie Schoten und Blüten ca. sechs Wochen alter Pflanzen. Die Pflanzen wurden bis zum 18. Tag auf 0,5x MS Medium mit 1 % (w/v) Saccharose kultiviert und anschließend in Erde umgesetzt.

Abb. 24 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der qualitativen GUS-Assays für jeweils zwei ausgewählte, voneinander unabhängige Promotor-Reportergen-Linien für His1-1, His1-2 und His 1-3 sowie als Kontrolle für den Wildtyp. Abb. 25 enthält zur besseren Veranschaulichung der Reportergenexpression vergrößerte Darstellungen für 6 bzw. 18 Tage alte Pflanzen, die ein His1-3 Promotor-Reportergenkonstrukt tragen. Die Promotoren von His1-1 und His1-2 sind im gesamten sechs Tage alten Keimling aktiv (Abb. 24). Der His1-3 Promotor ist nur den oberirdischen Pflanzenteilen aktiv, in der Wurzel von sechs Tage alten Keimlingen ist keine GUS-Aktivität nachweisbar (Abb. 24 bzw. 25). Die Promotoren von His1-1 und His1-2 sind auch in 18 Tagen alten Pflanzen ubiquitär aktiv. Der His1-3 Promotor zeigt wie im 6 Tage alten Stadium in den oberirdischen Pflanzenteilen eine GUS-Aktivität, weiterhin ist er im Wurzelgewebe aktiv. Jedoch ist die Aktivität des His1-3 Promotor-Reportergenkonstruktes in der Primärwurzel scheinbar stärker als in den Seitenwurzeln (Abb. 25a). In der Wurzel ist besonders der Zentralzylinder angefärbt (Abb. 25b).

Blätter fünf Wochen alter Pflanzen weisen für alle drei untersuchten Promotor-Reportergenkonstrukte eine starke Blaufärbung auf, ebenso wie die analysierten Schoten sechs Wochen alter Pflanzen (Abb. 24). In Blüten vermittelt der His1-1 Promotor eine starke GUS-Aktivität in allen untersuchten Organen. Kelchblätter, Kronblätter, Staubblätter sowie

der Stempel sind stark blaugefärbt. Das Promotor-Reportergenkonstrukt von His1-2 färbt im histochemischen GUS-Assay ebenfalls alle untersuchten Blütenorgane an, scheinbar jedoch weniger stark als das His1-1 Promotor-Reportergenkonstrukt. Der His1-3 Promotor ist in der Blüte nur schwach aktiv.

Die Stärke der Blaufärbung liefert nur einen indirekten Hinweis auf die Stärke der Reportergenexpression. Deshalb wurden zur Bestimmung der Stärke der Reportergenexpression quantitative GUS-Assays durchgeführt.

Für folgende Gewebe der Promotor-GUS-Pflanzen wurde die quantitative GUS-Aktivität bestimmt: Blatt- und Wurzelgewebe 18 Tage alter Pflanzen sowie die Sprossachse, Schoten und Blüten sechs Wochen alter Pflanzen. Es wurden je Promotor-Reportergenkonstrukt drei voneinander unabhängige Linien analysiert. Die GUS-Aktivität einer CaMV 35S GUS-Linie wurde quantifiziert, um die absolute Stärke der GUS-Aktivität der unterschiedlichen Promotor-Reportergenkonstrukte besser einschätzen zu können.

Die Ergebnisse der quantitativen GUS-Assays sind in Abbildung 26 dargestellt. Sie korrelieren mit den Ergebnissen aus der histochemischen Analyse. Zusätzlich zeigt die quantitative Analyse, dass die GUS-Aktivitäten der drei Linker-Histon Promotoren in den untersuchten Geweben unterschiedlich sind. Jeder der untersuchten Promotoren weist ein spezifisches Expressionsprofil auf. Die GUS-Aktivität des His1-1 Promotor-Reportergenkonstruktes ist in allen drei untersuchten Linien in der Blüte am stärksten und durchschnittlich im Wurzelgewebe am schwächsten. In der Blüte vermittelt der Promotor eine ca. dreifach stärkere Expression des Reportergens als in der Wurzel. Im Blattgewebe ist die GUS-Aktivität um ca. 20-50 % höher als im Wurzelgewebe. Die GUS-Werte für die Sprossachse bzw. für die Schote sind nicht ganz einheitlich. Für Linie 1 liegen die Werte für die Sprossachse bzw. für die Schote ca. 30-50 % unterhalb und für Linie 12 10-25 % Prozent oberhalb der GUS-Aktivität des Blattgewebes. Linie 10 weist für die Schote fast die gleiche Aktivität auf wie im Blatt, in der Sprossachse ist die Aktivität ca. 50 % höher als im Blatt.

Auch der Promotor von His1-2 ist in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana* unterschiedlich stark aktiv. Die für drei Promotor-GUS-Linien von His1-2 gemessenen GUS-Aktivitäten von Blättern, Schoten und Blüten befinden sich ungefähr auf einem Niveau. Sie sind ca. viermal höher als die GUS-Aktivitäten in der Wurzel bzw. in der Sprossachse alter Pflanzen.

Die Ergebnisse der quantitativen GUS-Assays von His1-3 Promotor-GUS-Linien zeigen, dass die GUS-Aktivität im Blattgewebe signifikant höher als in den anderen untersuchten Geweben ist. Für Linie 1 beträgt die GUS-Aktivität von der Wurzel, Schote und Blüte ca. 15-20 % der GUS-Aktivität von Blattgewebe. Am geringsten ist die GUS-Aktivität in der Sprossachse, wo die Aktivität des Promotors nur ca. 2,5 % der Aktivität im Blattgewebe

beträgt. Die Linien 2 und 3 weisen insgesamt niedrigere GUS-Werte auf als die Linie 1. Aber auch hier sind wie bei Linie 1 die Blattwerte signifikant höher als die Werte für die übrigen Gewebe (Abb. 26). Die quantitativen GUS-Werte für Blatt und Wurzel korrelieren mit den Ergebnissen der histochemischen Analyse. Für sechs Tage alte Keimlinge war histochemisch keine GUS-Aktivität nachweisbar, in Wurzeln von 18 Tagen alten Pflanzen beschränkte sich die GUS-Expression hauptsächlich auf die Primärwurzel.

Der Vergleich der quantitativen GUS-Aktivitäten der drei Promotoren der drei Linker-Histon Subtypen von *Arabidopsis thaliana* mit dem CaMV 35S Promotor (Abb. 26) zeigt, dass der Promotor von His1-1 in den drei untersuchten Linien mit Ausnahme der Wurzel in allen Geweben eine stärkere GUS-Aktivität als der CaMV 35S Promotor in der 35S GUS-Linie vermittelt. Die untersuchten Linien mit den Promotor-GUS-Konstrukten für His1-2 und His1-3 weisen durchschnittlich eine geringere GUS-Aktivität auf als die CaMV 35S GUS-Linie. Der His1-3 Promotor-GUS-Konstrukt vermittelt im Vergleich zu den His1-1 und His1-2 Promotor-GUS-Konstrukten insgesamt die geringste Reportergenaktivität.

Die His1-1 und His1-2 Promotor-GUS-Konstrukte vermitteln *in planta* eine ubiquitäre Expression des GUS-Gens. Allerdings unterscheiden sich die Expressionsstärken der beiden Promotoren je nach untersuchtem Gewebe. His1-3 ist am stärksten in Blättern aktiv.

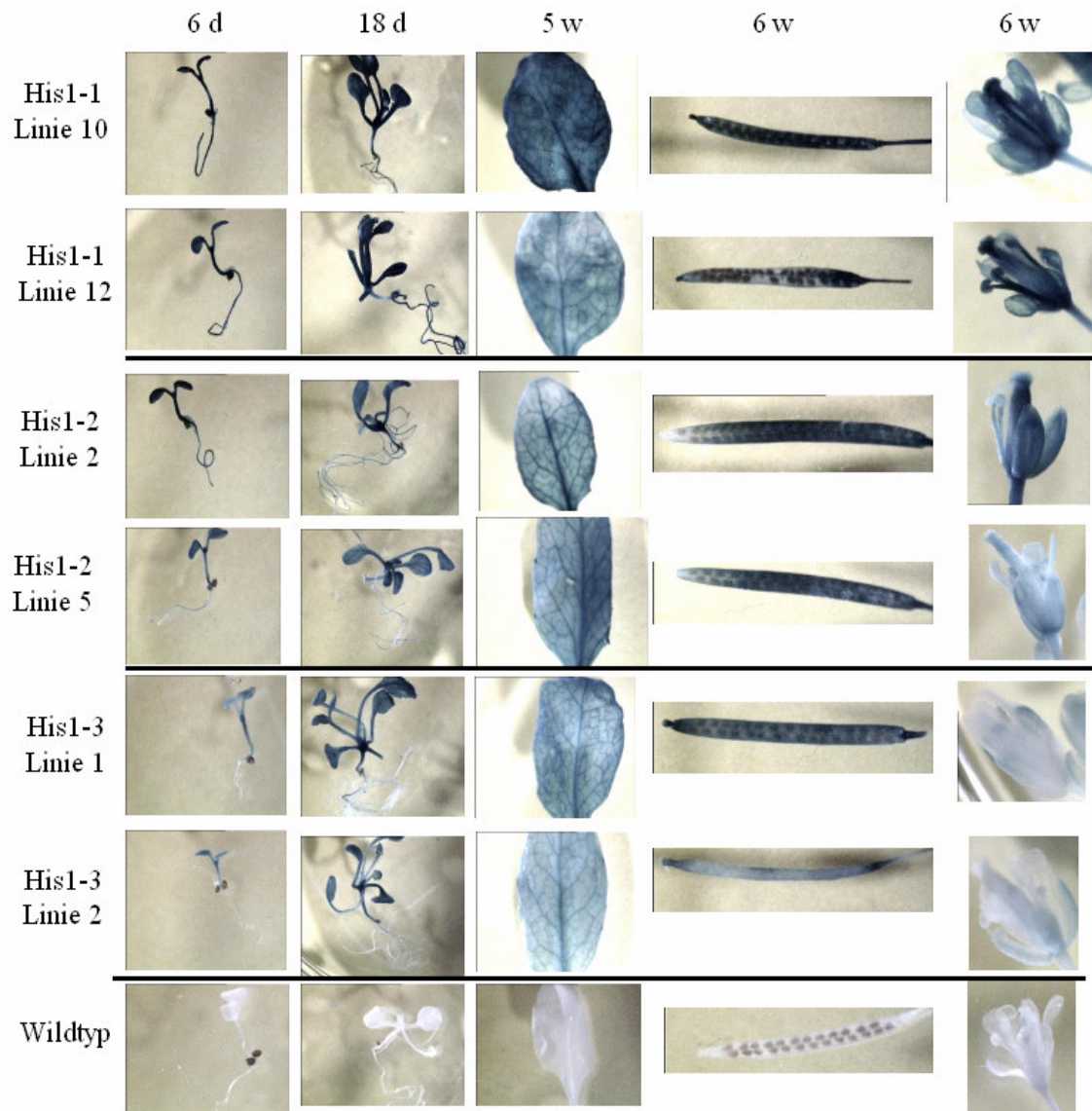


Abb. 24: Histochemische β -Glucuronidaseassays für Linker-Histon-Promoter GUS-Pflanzen. Promotor-GUS-Konstrukte für die Promotoren der drei Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* wurden stabil *in planta* transformiert. Zum Nachweis der GUS-Aktivität der drei Promotoren wurden histochemische GUS-Assays für unterschiedliche Stadien/Gewebe für jeweils zwei voneinander unabhängige Promotor-GUS-Linien sowie als Kontrolle für den Wildtyp durchgeführt: Keimling 6 und 18 Tage, Blatt 5 Wochen, Blüte und Schoten 6 Wochen. Die Promotoren werden nahezu konstitutiv exprimiert (siehe Text). Der nichttransgene Wildtyp zeigt keine GUS-Aktivität.

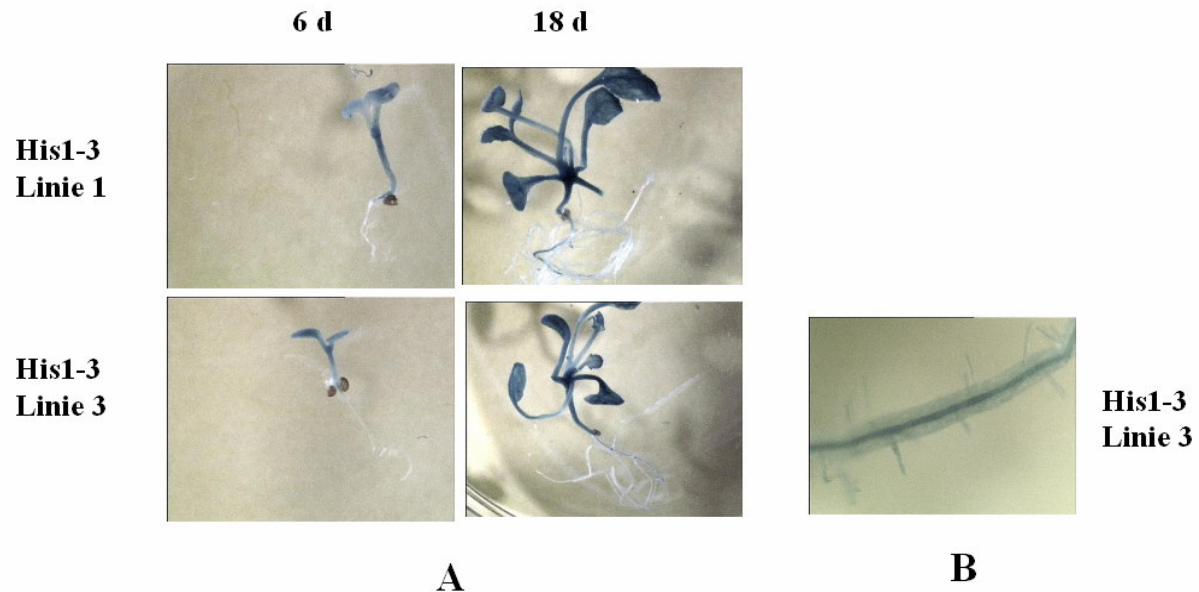


Abb. 25: Quantitative β -Glucuronidaseassays für His1-3 Promotor-GUS-Pflanzen (vergl. Abb. 24). (A) Vergrößerte Darstellung aus Abb. 24, 6 und 18 Tage alte Keimlinge mit einem His1-3 Promotor-GUS-Konstrukt. (B) Vergrößerung einer Primärwurzel. Der Promotor von His1-3 ist scheinbar am stärksten im Zentralzylinder aktiv.

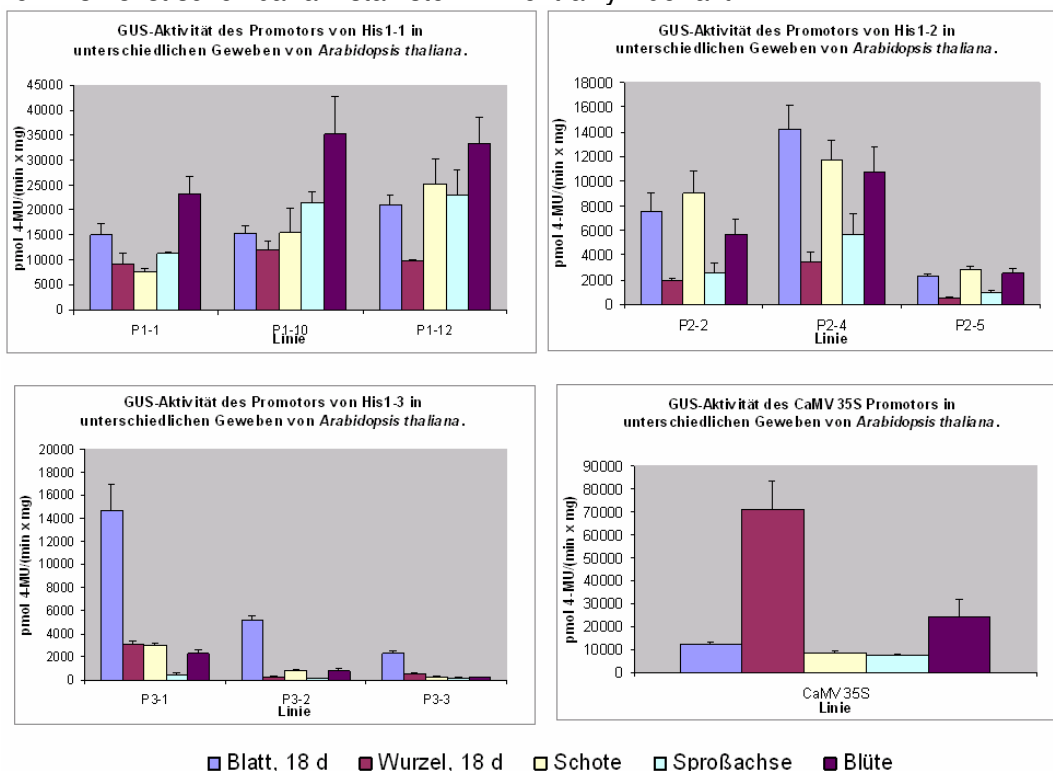


Abb. 26. Quantitative Analyse der Promotoraktivität der Linker-Histon Promotoren aus Arabidopsis thaliana. Promotor-GUS-Konstrukte für die Promotoren der drei Linker-Histon-Varianten von Arabidopsis thaliana wurden stabil in planta transformiert. Zum Nachweis der quantitativen GUS-Aktivität der drei Promotoren wurden GUS-Assays von unterschiedlichen Geweben für jeweils drei voneinander unabhängige Promotor-GUS-Linien sowie als Kontrolle für eine CaMV 35S GUS-Linie durchgeführt: Die Promotoren der drei Linker-Histon-Varianten zeigen jeweils spezifische Expressionsprofile (siehe Text).

3.3 Funktionsanalyse von Linker-Histon-Varianten in *Arabidopsis thaliana* mittels PTGS (Posttranskriptionelles Gen Silencing)

Zur funktionellen Analyse von Linker-Histon-Varianten in *Arabidopsis thaliana* wurde ein Ansatz der Reversen Genetik verfolgt. Ein Silencing der einzelnen Linker-Histone in transgenen Pflanzen sollte Rückschlüsse auf ihre Funktion liefern. Für das Silencing wurde die Methode des PTGS eingesetzt (siehe Einleitung).

Ihp-Konstrukte (Intron containing hairpin Konstrukte, Tab. 9), die für doppelsträngige RNA kodieren, wurden mittels Floral-Dip in *Arabidopsis thaliana* transformiert, um spezifisch die drei Linker-Histon-Varianten His1-1, His1-2 und His1-3 von *Arabidopsis thaliana* zu silencen. Kreuzungen zwischen den einzelnen Transformationsprodukten wurden durchgeführt, um alle Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* zu silencen. Die Selektion der Kreuzungsprodukte wurde dadurch erleichtert, dass die einzelnen Single-Knock-downs unterschiedliche pflanzliche Selektionsmarker tragen (Kap. 2.8.3, Tab. 9). Pflanzen, die ein ihp-Konstrukt für eine Variante enthalten, werden im Folgenden als Single-Knock-down Linien, Pflanzen, die ihp-Konstrukte für zwei bzw. drei Varianten enthalten, werden als Double- bzw. Triple-Knock-down Linien bezeichnet.

3.3.1 In planta transformierte ihp-Konstrukte reduzieren den mRNA-Gehalt ihrer Zielgene His1-1, His1-2, His1-3

Semiquantitative RT-PCR-Analysen wurden durchgeführt, um nachzuweisen, dass die transformierten Konstrukte ihr Zielgen silencen. Die Analysen wurden mit fünf voneinander unabhängigen Linien der ersten transgenen Nachfolgegeneration F₁ der jeweiligen Single-Knock-downs durchgeführt. Als Vergleich wurde eine Wildtyp-Linie analysiert. Bei den untersuchten Single-Knock-downs handelte es sich um die Linien A9, A10, A12, A15 und A16 (His1-1 Knock-downs), die Linien B1, B4, B5, B6 und B7 (His1-2 Knock-downs) sowie die Linien C3, C5, C6, C7 und C11 (His1-3 Knock-downs). Gesamt-RNA aus den aufgezählten Pflanzen sowie aus dem Wildtyp wurde aufgereinigt und in Erststrang-cDNA umgeschrieben. Die Erststrang-cDNA wurde als Template für die Quantifizierung der Transkripte von His1-1, His1-2 und His1-3 eingesetzt (Kap. 2.10.1). Für den Nachweis der Transkripte von His1-1 und His1-2 durchlief das PCR-Programm 26 Amplifikationszyklen, für den Nachweis von His1-3 30 Amplifikationszyklen. Nach der PCR wurden die Amplifikate jeweils über ein Agarosegel quantifiziert. In Abb. 27 sind die Ergebnisse der PCR-Analysen für die einzelnen Single-Knock-down Linien dargestellt.

Single-Knock-down Linien weisen verglichen mit dem Wildtyp geringere Transkriptmengen derjenigen Gene auf, gegen die das ihp-Konstrukt gerichtet ist. Während im Wildtyp für das His1-1- und His1-2 Transkript nach der PCR ungefähr gleiche Mengen an Amplifikat

nachgewiesen wurden, wurde in His1-1 Single-Knock-down Linien weniger His1-1 als His1-2 Transkript amplifiziert (Abb. 27a). In His1-2 Single Knock-down Linien verhält es sich entsprechend. Hier wurde weniger His1-2 Transkript amplifiziert als His1-1 Transkript (Abb. 27b). In His1-3 Single-Knock-down Pflanzen ist im Vergleich zum Wildtyp der Gehalt an His1-3 reduziert (Abb. 27c).

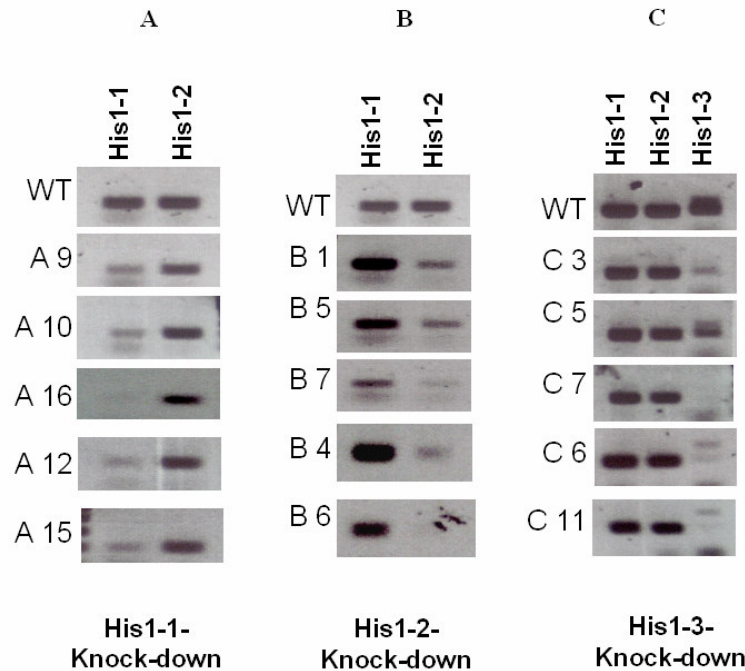


Abb. 27: Reduzierung des Transkriptgehaltes von His1-1, His1-2 und His1-3 durch ihp-Konstrukte (intron containing hairpin dsRNA-Konstrukte). Gesamt-RNA wurde aus Pflanzen isoliert, die ihp-Konstrukte für das Silencing von His1-1, His1-2 und His1-3 enthalten, sowie aus dem Wildtyp. Semiquantitative RT-PCRs wurden durchgeführt, um die mRNA-Mengen der angegebenen Linker-Histon-Varianten zu quantifizieren. Die Spalten sind mit der nachgewiesenen mRNA beschriftet, jeweils links ist die analysierte Linie aufgeführt. **(A)** Analyse von His1-1-Knock-down Linien **(B)** Analyse von His1-2-Knock-down Linien **(C)** Analyse von His1-3-Knock-down Linien. Die Menge an amplifizierter cDNA ist in der entsprechenden Knock-down-Linie geringer als im Wildtyp (WT).

Die transformierten ihp-Konstrukte verringern *in planta* den Gehalt ihrer Zielgene. Dieses deutet darauf hin, dass sie funktionell sind und ihre jeweiligen Zielgene silencen. Um den Silencing-Effekt der ihp-Konstrukte näher zu untersuchen, wurde mit jeweils einer ausgewählten Single-Knock-Linie für His1-1, His1-2 und His1-3 sowie als Vergleich für den Wildtyp, eine umfassendere semiquantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. In dieser PCR-Analyse wurden die PCR-Amplifikate nach 22, 24, 26, 28, 30 und 32 Zyklen (für His1-1, His1-2) bzw. nach 26, 28, 30, 32, 34 und 36 Zyklen (His1-3) über ein Agarosegel quantifiziert. Als Kontrolle, dass gleiche Ausgangsmengen an Template für die Quantifizierung der Transkripte aus den einzelnen Knock-downs bzw. aus dem Wildtyp eingesetzt worden waren, wurde ein Housekeeping-Gen, die GapC, amplifiziert. Für die

umfassendere, zweite PCR-Analyse wurden die Single-Knock-down Linien A16, B1 und C7 untersucht. Abb. 28 fasst das Ergebnis dieser PCR-Analyse zusammen. Die zweite PCR-Analyse bestätigt das Ergebnis der ersten PCR-Analyse (Abb. 27 und 28). Es wird sowohl in His1-1-, His1-2- als auch in His1-3 Single-Knock-down Linien, verglichen mit dem Wildtyp, weniger Transkript des jeweiligen Zielgens der ihp-Konstrukte amplifiziert.

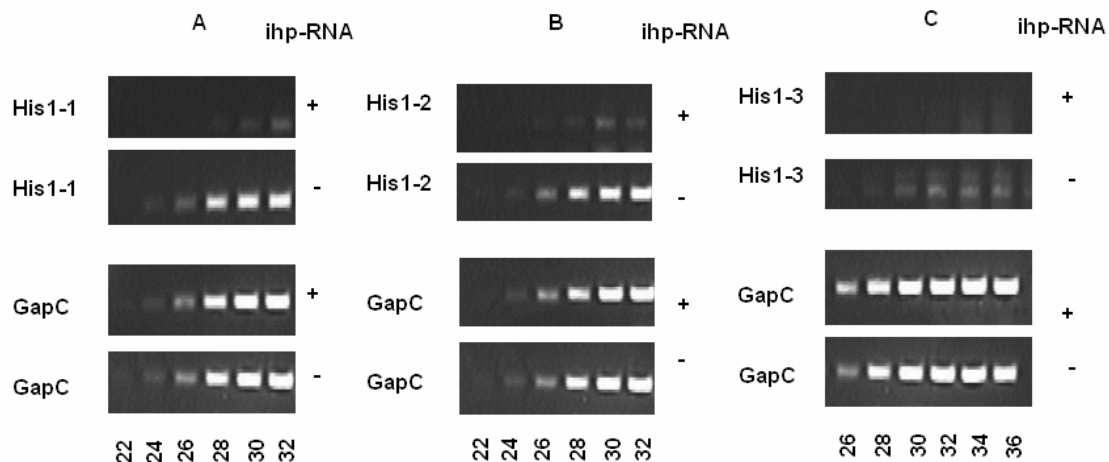


Abb. 28: Reduzierung des Transkriptgehaltes von His1-1, His1-2 und His1-3 durch ihp-Konstrukte. Gesamt-RNA wurde aus Pflanzen isoliert, die ihp-Konstrukte für das Silencing von His1-1 (+), His1-2 (+) und His1-3 (+) enthalten, sowie aus dem Wildtyp (-). Semiquantitative RT-PCRs wurden durchgeführt, um die mRNA-Mengen der angegebenen Linker-Histon-Varianten und der GapC-Kontrolle zu quantifizieren. PCRs wurden mit einer unterschiedlichen Anzahl an Amplifikationszyklen durchgeführt (angegeben im unteren Bereich der Abbildung). Pflanzen die das entsprechende ihp-Konstrukt enthalten sind mit „+“ markiert, der Wildtyp ist mit „-“ markiert. **(A)** His1-1 Knock-down, Vergleich mit dem Wildtyp **(B)** His1-2 Knock-down, Vergleich mit dem Wildtyp **(C)** His1-3 Knock-down, Vergleich mit dem Wildtyp. Die Menge an nachgewiesener Linker-Histon-mRNA ist wesentlich geringer als im Wildtyp.

Ein Ziel der Arbeit war es, nicht nur eine, sondern alle Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* zu silencen, also Triple-Knock-downs zu generieren. Da der Transkriptgehalt der einzelnen Linker-Histon-Varianten in den jeweiligen Single-Knock-downs reduziert war (Abb. 27 und 28), wurden durch Kreuzungen zwischen den einzelnen Single-Knock-downs Triple-Knock-down Linien hergestellt. Für die Kreuzungen wurden nur Linien mit einem T-DNA-Locus eingesetzt. Insgesamt wurden drei unterschiedliche Triple-Knock-down Linien generiert.

Es wurde untersucht, ob auch in den Double- und Triple-Knock-down Linien der mRNA-Gehalt der betreffenden Zielgene reduziert ist. Dazu wurden die Transkriptmengen der einzelnen Linker-Histon-Varianten sowie der GapC für einzelne Linien mittels semiquantitativer RT-PCR quantifiziert. Abb. 29 zeigt die Ergebnisse der PCR-Analyse für

jeweils eine der untersuchten Double- bzw. Triple-Knock-down Linien. Als Vergleich wurden der Wildtyp sowie jeweils eine Single-Knock-down Linie analysiert.

Die *ihp*-Konstrukte reduzieren auch im Double-Knock-down bzw. im Triple-Knock-down den mRNA-Gehalt ihrer Zielgene. Im His1-1/His1-2 Double-Knock-down wird, verglichen mit dem Wildtyp, weniger His1-1 und His1-2 Transkript quantifiziert, der Gehalt an His1-3 Transkript ist ungefähr so hoch wie im Wildtyp. Im Triple-Knock-down wird eine Reduktion aller Linker-Histon Transkripte nachgewiesen. Die gleiche Beobachtung wurde auch für die übrigen untersuchten Triple-Knock-downs gemacht (nicht gezeigt).

Die transformierten *ihp*-Konstrukte scheinen sowohl in Linker-Histon Single-, als auch in Double- und Triple-Knock-down Linien funktionell zu sein, da sie den Gehalt ihrer jeweiligen Zielgene auf mRNA-Ebene im Vergleich zum Wildtyp reduzieren.

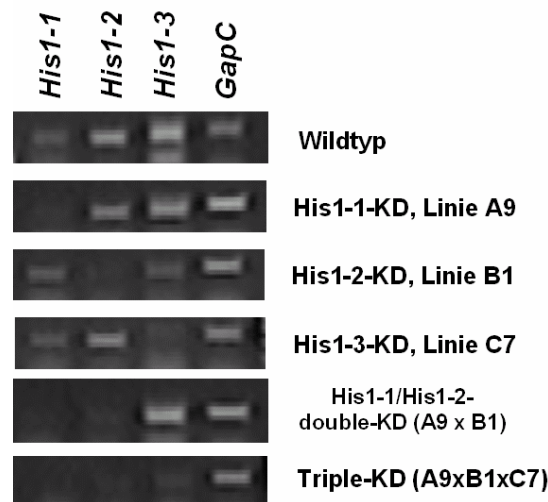


Abb. 29: Reduzierung des Transkriptgehaltes von His1-1, His1-2 und His1-3 durch *ihp*-Konstrukte in Linker-Histon Single-, Double-, und Triple-Knock-down Linien. Die Transkriptmengen von His1-1, His1-2 und His1-3 sowie als Kontrolle von der GapC wurden quantifiziert. In Single-, Double-, und Triple-Knock-down Linien reduzieren die jeweiligen *ihp*-dsRNA-Konstrukte den Transkriptgehalt der entsprechenden Zielgene. Jeweils angegeben sind die untersuchten Linien bzw. die Linien, die für die Kreuzungen eingesetzt wurden (KD: Knock-down).

3.3.2 Linker-Histon Knock-down Pflanzen zeigen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp

Es wurde untersucht, ob Linker-Histon Single- und Triple-Knock-down Pflanzen einen zum Wildtyp abweichenden Phänotyp aufweisen. Dazu wurde der Phänotyp von jeweils zwei Single-Knock-down Linien und zwei durch Kreuzung generierten Triple-Knock-down Linien mit dem Wildtyp verglichen. Eingesetzt wurden die Single-Knock-down Linien A9, A16, B1,

B6, C7 und C11 sowie Triple-Knock-down Linien, die aus Kreuzungen der Single-Knock-down Linien A9, B1 und C7 bzw. A16, B6 und C11 hervorgegangen sind.

Abb. 30 zeigt einen Vergleich von Triple-Knock-down Pflanzen mit dem Wildtyp. Die Pflanzen weisen keinen unterschiedlichen Phänotyp auf. Auch in den anderen untersuchten Stadien wurden weder entwicklungsspezifische noch morphologische Unterschiede beobachtet (nicht gezeigt). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigen auch die untersuchten Single-Knock-down Linien keine phänotypischen Auffälligkeiten (nicht gezeigt).



Abb. 30: Vergleich der Phänotypen einer Linker-Histon Triple-Knock-down Linie mit dem Wildtyp. Die Darstellung zeigt Pflanzen der Linker-Histon Triple-Knock-down Linie, die aus den Kreuzungen zwischen den Single-Knock-downs A16, B6 und C11 hervorgegangen ist, sowie Wildtyppflanzen. Die Pflanzen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Sie zeigen keine phänotypischen Unterschiede.

3.3.3 Western-Blot-Analyse von Triple-Knock-down Linien

Linker-Histon Triple-Knock-down Pflanzen weisen keinen zum Wildtyp abweichenden Phänotyp auf (Abb. 30). Dies kann zwei Gründe haben. 1. Die Linker-Histone sind in *Arabidopsis thaliana* nicht essentiell. 2. Die Reduktion der Transkriptmengen der Linker-Histon-Varianten durch die transformierten ihp-Konstrukte ist nicht ausreichend, um einen Effekt auf den Phänotyp zu bewirken. Deshalb wurde untersucht, ob auch der Gehalt der Linker-Histone auf Proteinebene reduziert ist. Dazu wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Für die Western-Blot-Analyse wurden bei der Firma SeqLab (Göttigen) Antikörper gegen die einzelnen Linker-Histon-Varianten in Auftrag gegeben (Kap. 2.7). Die gelieferten Antikörper wurden zunächst mit in *E. coli* überexprimierten und aufgereinigten rekombinanten Linker-Histonen auf ihre Funktionalität und Spezifität untersucht. Anschließend wurden sie für Western-Blot-Analysen mit Kernproteinen aus den Triple-Knock-down Linien eingesetzt.

3.3.3.1 Funktionsanalyse der Antikörper gegen His1-1, His1-2 und His1-3 mit in *E. coli* überexprimierten rekombinanten Linker-Histonen

Für den Nachweis der drei Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana* mittels Western-Blot wurden bei der Firma SeqLab (Göttingen) Peptide synthetisiert, die spezifisch für die einzelnen Linker-Histon-Varianten sind. Diese Peptide wurden für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt, um Antikörper gegen His1-1, His1-2 und His1-3 herzustellen. Für die Affinitätsaufreinigung der Antikörper aus dem gelieferten Serum wurden die synthetisierten Peptide kovalent an eine Affi-Gel-10-Matrix (Bio-Rad) gebunden. Über diese Matrix wurden die Antikörper aufgereinigt (Kap. 2.11.8). Für eine Funktionsanalyse der aufgereinigten Antikörper wurden die drei Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli* überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule über den 6xHis-Tag aufgereinigt (Kap. 2.11.7). Die rekombinanten Proteine wurden auf ein 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Blots wurden für eine Western-Blot-Analyse mit den aufgereinigten Antikörpern eingesetzt (Kap. 2.11.9). Abb. 31 zeigt die Ergebnisse der PonceauS-Anfärbung des Blots (Abb. 31a) sowie die der Western-Blot-Analyse mit den aufgereinigten Antikörpern (31b, c und d).

Die rekombinanten Linker-Histon-Varianten wandern im SDS-Gel wesentlich langsamer als es ihrem theoretischen Molekulargewicht entspricht. Die Linker-Histon-Varianten haben folgende, berechnete Molekulargewichte (ohne den 6xHis-Tag, der ein Molekulargewicht von ca. 1 kDa hat): His1-1 28,9 kDa, His1-2 28,4 kDa und His1-3 19,0 kDa (Angaben von www.arabidopsis.org). Im SDS-Gel laufen His1-1 und His1-2 jedoch auf einer Höhe, die einem Molekulargewicht von ca. 47 kDa entspricht, und His1-3 auf einer Höhe von ca. 33 kDa (Abb. 31a). Ein ähnliches Laufverhalten wurde auch für *in vitro* translatierte Linker-Histon-Varianten beobachtet (nicht gezeigt). Das abweichende Laufverhalten wird dadurch verursacht, dass es sich bei Linker-Histonen um stark basische, unter physiologischen Bedingungen stark positiv geladene Proteine handelt. Stark positiv geladene Proteine binden im Verhältnis mehr negativ geladene SDS-Moleküle als andere Proteine und wandern daher langsamer im SDS-Gel (Hames und Rickwood, 1996).

Die affinitätsgereinigten Antikörper gegen His1-1 und His1-3 sind funktionell und binden spezifisch an die jeweilige Linker-Histon-Variante (Abb. 31b und d). Die Immunfärbung lieferte für beide Antikörper ein starkes Signal. Im Gegensatz dazu binden die aufgereinigten Antikörper gegen His1-2 nur in einem sehr geringen Maße an His1-2 und bewirken in der Immunfärbung ein sehr schwaches Signal (Abb. 31c). Weiterhin sind die gegen His1-2 hergestellten Antikörper nicht spezifisch für His1-2, da sie auch schwach an His1-3 binden.

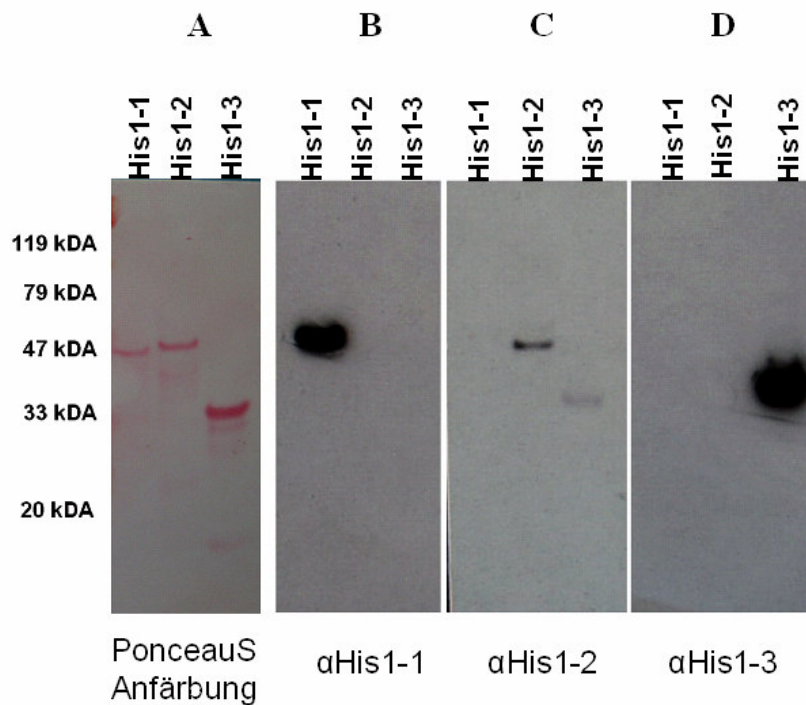


Abb. 31: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Funktionalität und der Spezifität der Antikörper gegen His1-1, His1-2 und His1-3. Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana* wurden in *E. coli* überexprimiert, über einen 6xHis-Tag aufgereinigt und nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die geblotteten Proteine wurden mit (A) PonceauS angefärbt und mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen (B) His1-1, (C) His1-2 bzw. (D) His1-3 immungefärbt. Bildbeschriftung oben: aufgetragene Linker-Histon-Variante. Die Antikörper gegen His1-1 und His1-3 sind spezifisch für die jeweilige Linker-Histon-Variante. Der Immunfärbung für His1-2 ist sehr schwach, zudem bindet der Antikörper gegen His1-2 auch an His1-3. Die Peroxidasereaktion mit dem Antikörper gegen His1-2 wurde zwanzigmal länger gegen einen Röntgenfilm exponiert als die Reaktionen mit den Antikörpern gegen His1-1 und His1-3.

3.3.3.2 Auf Proteinebene ist kein Silencing von His1-1 in Triple-Knock-down Pflanzen nachweisbar.

Die semiquantitativen RT-PCR-Analysen hatten gezeigt, dass die ihp-Konstrukte in Linker-Histon Single-, Double- und Triple-Knock-down Linien die Transkriptmengen ihrer Zielgene reduzieren (Abb. 27, 28 und 29). Da Triple-Knock-down Linien keinen abweichenden Phänotyp aufwiesen (Abb. 30), wurden die Effekte der transformierten Konstrukte auf Proteinebene untersucht. Um die Frage zu klären, ob ein Silencing in den Triple-Knock-down Linien auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Analysiert wurden drei aus Kreuzungen von Single-Knock-down Linien hervorgegangene Triple-Knock-down (TKD) Linien (TKD Nr. 1: A16 x B6 x C11; TKD Nr. 2 A9 x B1 x C7, TKD

Nr. 3 A10 x B7 x C7) sowie als Kontrollen eine homozygote His1-1-Knock-out-Linie (vergl. Kap. 2.12.1.3, Salk-Linie 128430) und der Wildtyp. Für die Western-Blot-Analyse wurden säurelösliche Kernproteine aus 16 Tagen alten Pflanzen isoliert (Kap. 2.11.6). Die Konzentration der aufgereinigten säurelöslichen Kernproteine wurde bestimmt, anschließend wurden gleiche Mengen an säurelöslichen Kernproteinen (ca. 5 µg) über eine Acid-Urea-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.11.5). In *E. coli* überexprimiertes und aufgereinigtes His1-1 wurde als Kontrolle aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden zunächst zu Dokumentationszwecken mit Coomassie-Blue angefärbt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Für die Immunfärbung wurde der affinitätsgereinigte Antikörper gegen His1-1 eingesetzt. Abb. 32 zeigt das angefärbte Gel (Abb. 32a) sowie das Ergebnis der Immunfärbung (Abb. 32b).

Auf Proteinebene ist in den untersuchten Triple-Knock-down Linien kein Silencing von His1-1 nachweisbar (Abb. 32b). Im Vergleich zum Wildtyp ist die Menge an His1-1 nicht reduziert. Wie erwartet ist in dem His1-1-Knock-out kein His1-1 nachweisbar. Das Ergebnis, dass in den Triple-Knock-down Linien kein Silencing nachweisbar ist, korreliert nicht mit den Ergebnissen aus der semiquantitativen RT-PCR, wo eine Reduktion des His1-1 Transkriptgehaltes nachgewiesen wurde (Kap. 3.3.1, Abb. 29).

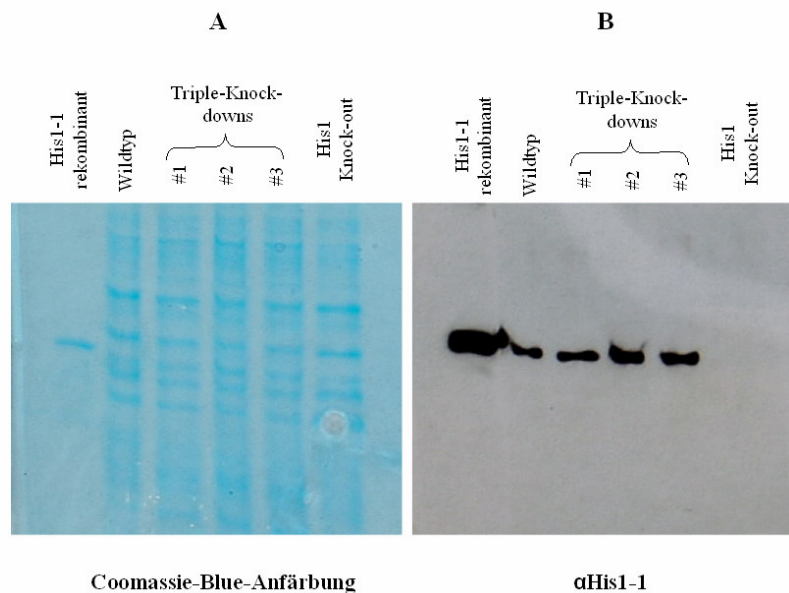


Abb. 32: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Silencing-Effektes in Linker-Histon Triple-Knock-down Linien. Säurelösliche Kernproteine wurden aus Wildtyp, drei Triple-Knock-down Linien und einer homozygoten His1-1-Knock-out-Linie aufgereinigt und mittels Acid-Urea-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurde in *E. coli* überexprimiertes rekombinantes His1-1 aufgetragen (Bahn 1) (A) Coomassie-Blue gefärbtes Gel (B) Immunfärbung mit Antikörper gegen His 1-1. Auf Proteinebene ist kein Silencing nachweisbar. Die Menge an His1-1-Protein ist den drei Triple-Knock-down Linien nicht reduziert. Im Knock-out ist kein His1-1 nachweisbar.

3.3.4 Analyse von His1-1- Single-Knock-downs

Aufgrund der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse mit den Triple-Knock-down-Linien, in denen für His1-1 keine Reduzierung des Proteingehalts nachgewiesen wurde, wurde untersucht, ob Single-Knock-down Linien Silencing-Effekte aufweisen. Dazu wurden Western-Blot-Analysen (Kap. 3.3.4.1), semiquantitative RT-PCRs (Kap. 3.3.4.2) sowie eine Northern-Blot-Analyse zum Nachweis von siRNAs (Kap. 3.3.4.3) mit sechs voneinander unabhängigen His1-1-Single-Knock-down Linien durchgeführt. Der Silencing-Effekt in His1-2 und His1-3-Single-Knock-down Linien wurde nicht näher untersucht.

3.3.4.1 His1-1 Single-Knock-down Linien mit zwei T-DNA-Loci weisen reduzierten His1-1-Proteingehalt auf

In den Triple-Knock-down Linien war auf Proteinebene kein Silencing von His1-1 nachweisbar (Abb. 32). Daher wurde untersucht, ob der His1-1-Proteingehalt in den Single-Knock-downs von His1-1 reduziert ist. Sechs voneinander unabhängige His1-1 Single-Knock-down Linien wurden für diese Analysen eingesetzt. Durch die Segregationsanalyse der ersten transgenen Nachfolgegeneration (nicht gezeigt) war bekannt, dass drei dieser Linien über zwei T-DNA-Loci (Linien A12, A14, A18) verfügen und drei über einen T-DNA-Locus (Linien A9, A10, A16). Analysiert wurde jeweils ein Gemisch der Nachkommen aus ca. 7-9 Pflanzen der ersten transgenen Nachfolgegeneration F_1 . Da es sich um ein Gemisch aus einer größeren Zahl an Pflanzen handelt, wurde davon ausgegangen, dass die eingesetzten Pflanzen die F_1 -Generation repräsentieren. Säurelösliche Kernproteine wurden aus den 6 genannten Linien, aus dem Wildtyp und der homozygoten His1-1-Knock-out-Linie aufgearbeitet und über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen His1-1 immungefärbt. Abb. 33 stellt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse dar. In vier der sechs untersuchten Single-Knock-down ist der Proteingehalt von His1-1 signifikant reduziert (Linien A12, A14, A18, A16). Für zwei der vier Linien mit reduziertem Proteingehalt ist gar kein Protein mehr nachweisbar (A18, A16). Drei der vier Linien verfügen über zwei T-DNA-Loci, eine über einen T-DNA-Locus. Die beiden Linien, die keinen reduzierten Proteingehalt aufweisen, verfügen nur über einen T-DNA-Locus (A9, A10).

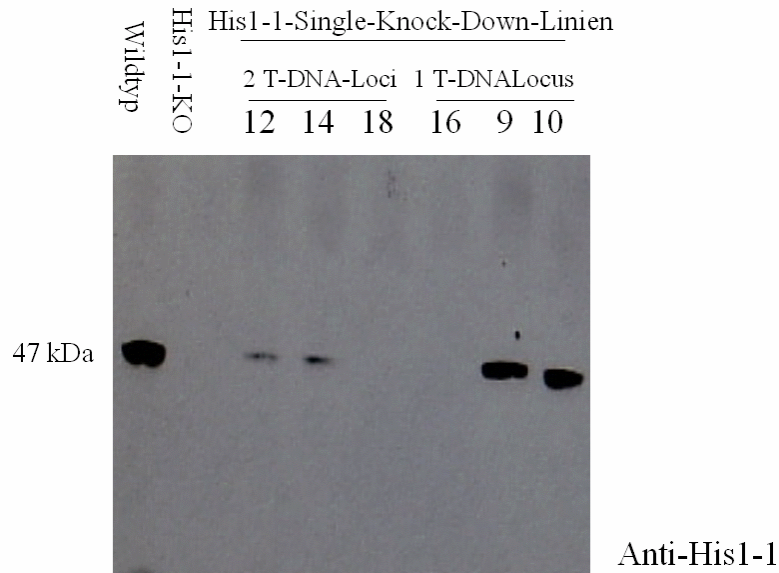


Abb. 33: Western-Blot-Analyse von His1-1 Single-Knock-down Pflanzen. Säurelösliche Kernproteine wurden aus drei His1-1 Single-Knock-down Linien mit zwei T-DNA-Loci, aus drei His1-1 Single-Knock-down Linien mit einem T-DNA-Locus, aus einer homozygoten His1-1-Knock-out-Linie sowie aus dem Wildtyp aufgereinigt. Die Proteine wurden durch eine 12 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Nu-PAGE, Invitrogen) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Für die Immunfärbung wurde ein affinitätsgereinigter Antikörper gegen His1-1 eingesetzt. In vier Linien, davon drei Linien mit zwei T-DNA-Loci, ist der His1-1 Proteingehalt im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. In zwei dieser vier Linien ist kein Protein mehr nachweisbar.

3.3.4.2 His1-1 Single-Knock-down Linien mit einem und mit zwei T-DNA-Loci weisen einen reduzierten His1-1 mRNA-Gehalt auf

Der Gehalt an His1-1 Transkript von sechs His1-1 Single-Knock-Linien wurde durch semiquantitative RT-PCR-Analysen nochmals quantifiziert. Für diese Analysen wurde vorgegangen wie in Kap. 3.3.1 beschrieben, jedoch wurde für die Herstellung der Erststrang-cDNA nicht Gesamt-RNA aus Pflanzen der F₁-Generation aufgereinigt, sondern aus Pflanzen eines Gemisches der F₂-Generation (wie in Kap. 3.3.4.1). Als Kontrollen wurden der Wildtyp und eine His1-2-Knock-down Linie (B1) analysiert. Die Ergebnisse der RT-PCR sind in Abb. 34 dargestellt. Die Menge an amplifizierter His1-1-cDNA ist in allen untersuchten Linien geringer als im Wildtyp, also auch in den beiden Linien A9 und A10, für die auf Proteinebene kein Silencing nachweisbar war. In der Linie B1 ist erwartungsgemäß das His1-2 Transkript im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

His1-1-Knock-down-Linien weisen unabhängig davon, ob in ihnen ein Silencing auf Proteinebene vorliegt, einen reduzierten His1-1 Transkriptgehalt auf. Der Grad der Reduktion des His1-1 Transkriptgehaltes in den Linien mit bzw. ohne Silencing-Effekt auf Proteinebene ist vergleichbar (vergleiche z.B. Linie A9 und A18, Abb. 34 mit A9 und A18, Abb. 33). Dies

bedeutet, dass eine Reduktion des Transkriptmenge nicht in jeder Linie eine Reduktion des Proteingehaltes zur Folge hat.

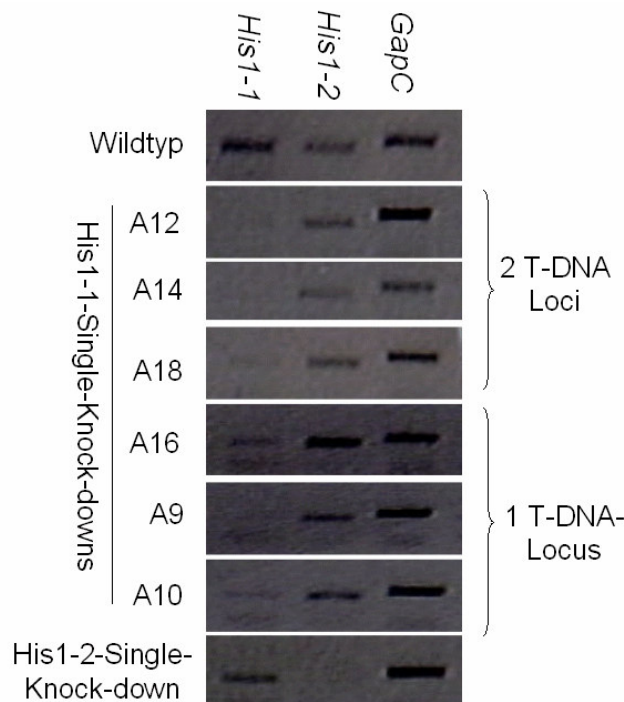


Abb. 34: Reduzierung des Transkriptgehaltes von His1-1 durch ihp Konstrukte. Gesamt-RNA wurde aus drei His1-1-Knock-down Linien mit einem T-DNA-Locus und aus drei Linien mit zwei T-DNA-Loci, aus dem Wildtyp und einer His1-1 Single-Knock-down Linie (B1) isoliert. Die Quantifizierung des His1-1 Transkriptes, des His1-2 Transkriptes und als Kontrolle des GapC Transkriptes erfolgte über semiquantitative RT-PCR. Oben ist angegeben, welche mRNA quantifiziert worden ist, jeweils links die analysierte Linie. Die Menge an amplifizierter His1-1 cDNA ist in allen untersuchten His1-1 Single-Knock-down Linien geringer als im Wildtyp (WT).

3.3.4.3 Das ihp-Konstrukt für His1-1 bewirkt *in planta* die Bildung von siRNAs

Doppelsträngige RNA wird durch Posttranskriptionelles Gen Silencing zu ca. 21-23 nt langen RNAs, den siRNAs, degradiert (siehe Einleitung).

Zum Nachweis, dass die Reduktion des His1-1 Transkriptes in den untersuchten His1-1 Single-Knock-down Linien mit der Bildung von siRNAs korreliert, wurde eine Northern-Blot-Analyse zur Detektion von His1-1 spezifischen siRNAs durchgeführt. RNAs mit geringem Molekulargewicht (kleine RNAs: tRNAs, 5S-RNA, siRNAs) wurden aus den 6 His1-1 Single Knock-down Linien aufgereinigt (Kap. 2.10.4). Jeweils 5 µg kleiner RNAs wurden über ein 17 % denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die aufgetrennten RNAs wurden auf eine HybondN-Nylonmembran transferiert und mit einem [³²P] γ-ATP markierten, His1-1 spezifischen DNA-Oligonukleotid hybridisiert (Kap. 2.10.5). Abb. 35 zeigt eine Abbildung des Polyacrylamidgels sowie das Autoradiogramm der Northern-Blot-Analyse. Mit Ausnahme von Linie 10 wurden in den untersuchten His1-1-Knock-down Linien His1-1 spezifische, ca. 23-

24 nt lange siRNAs nachgewiesen (Abb. 35b). Linie A10 ist eine der beiden Linien, in der der His1-1 Proteingehalt im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert war (Abb. 33). Im Gegensatz dazu liegen in der zweiten Linie mit unverändertem Proteingehalt, Linie A9, siRNAs vor. Im Wildtyp wurden erwartungsgemäß keine siRNAs nachgewiesen (Abb. 35b).

Durch die Northern-Blot-Analyse konnte in fünf der untersuchten sechs Linien die Anwesenheit von His1-1 spezifischen siRNAs nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion des Transkriptgehalts in His1-1 Single-Knock-down Linien (Abb. 34) auf PTGS zurückzuführen ist.

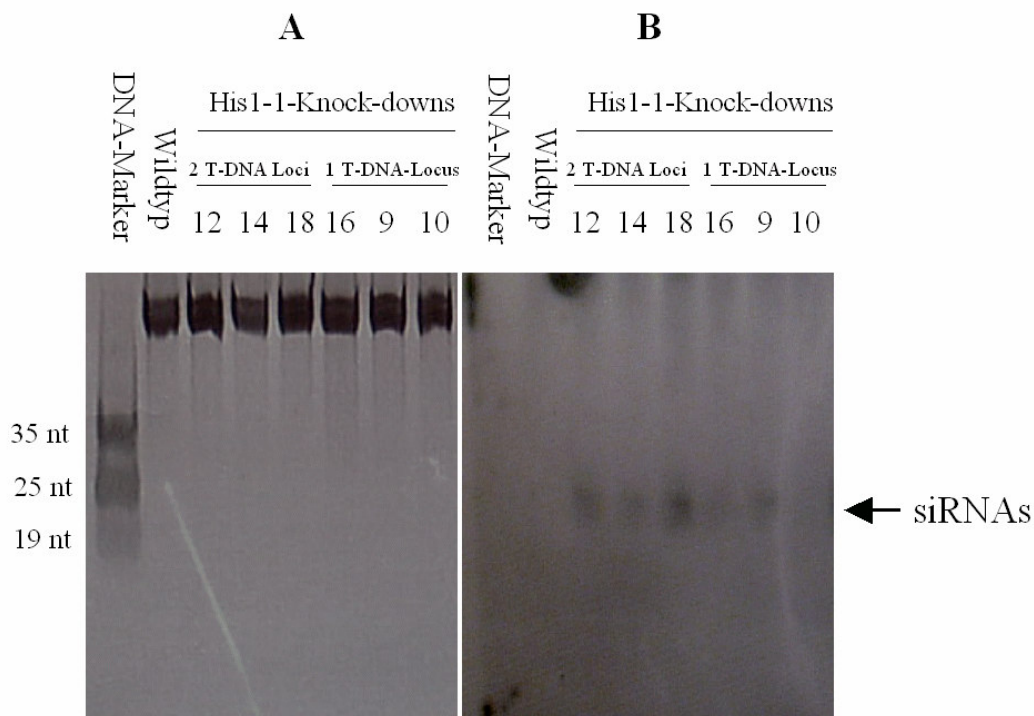


Abb. 35: Northern-Blot-Analyse zum Nachweis His1-1 spezifischer siRNAs in His1-1 Single-Knock-down Linien. 5 µg kleiner RNAs wurden auf einem 17 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer His1-1 spezifischen DNA-Oligonukleotid-Sonde hybridisiert. (A) mit Ethidiumbromid angefärbte RNA (B) Autoradiogramm des Northern-Blots. Beschriftung oben: Linie, Beschriftung seitlich: DNA-Oligonukleotidstandard. SiRNAs sind mit einem Pfeil markiert. In fünf von sechs His1-1-Knock-down Linien werden siRNAs detektiert.

4. Diskussion

4.1 Expressionsanalyse von fünf Promotoren aus der Zuckerrübe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von fünf putativ pfahlwurzel-spezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe untersucht. Die Promotoren gehören zu Genen, die in der Zuckerrübe in der Wurzel bzw. in der Rübe, nicht aber im Blatt exprimiert werden (Kloos *et al.*, 2002, Kloos und Hehl, pers. Mitteilung). Die Expressionsanalysen wurden in der Zuckerrübe sowie in Tabak durchgeführt.

Durch die Expressionsanalyse der Promotoren mit stabil in die Zuckerrübe transformierten Promotor-Reportergenkonstrukten konnte gezeigt werden, dass zwei der untersuchten Promotoren, der BvMll Promotor (Abb. 8) bzw. der BvTlp1 Promotor (Abb. 4), übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Suppression-Subtractive-Hybridization Experimenten (siehe Einleitung, Abb. 1), in der Zuckerrübe wurzelspezifisch exprimiert werden. Die anderen drei untersuchten Promotoren von BvSmp, BvTlp2 und BvHis1-r weisen auch im Blatt der Zuckerrübe eine erhöhte Expression des Reportergens auf (Abb. 6, 10 und 12). Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den zwei SSH-Experimenten, da für die Expressionsanalyse der einzelnen Promotoren Zuckerrüben aus anderen als die für die SSH-Experimente eingesetzten Stadien untersucht worden sind. Im Rahmen der Expressionsanalyse wurden ca. drei bzw. ca. sechs Monate alte Zuckerrüben untersucht. Für die erste SSH hingegen, in der vier Gene der untersuchten Promotoren isoliert worden sind, war mRNA aus Zuckerrüben, die sich im zweiten Jahr ihrer Entwicklung befanden, gegeneinander subtrahiert worden (Kloos *et al.*, 2002). In der zweiten SSH, die zur Isolierung von BvTlp2 führte, wurde mRNA aus Zuckerrüben zum Zeitpunkt der Ernte und unterschiedlichen Zeitpunkten der Lagerung gegeneinander subtrahiert (Kloos und Hehl, pers. Mitteilung). Wie die durchgeführten Expressionsanalysen zeigen, sind drei der Promotoren in den im Rahmen der Expressionsanalyse untersuchten Stadien auch im Blatt aktiv (Abb. 6, Abb. 10 und Abb. 12).

4.1.1 Vergleich der Expressionsprofile der fünf untersuchten Promotoren in Tabak und in der Zuckerrübe

Die gewebespezifische Expression von Genen ist ein Resultat von komplexen Ereignissen, die auf unterschiedlichen Ebenen der Genregulation ablaufen. Ein Promotor, der im homologen System ein bestimmtes Expressionsprofil zeigt, kann in einer anderen Pflanze ein anderes Expressionsprofil aufweisen, da die heterologen Transkriptionsfaktoren nicht oder nur wenig effektiv mit den *cis* Elementen des Promotors interagieren (Potenza *et al.*, 2004). Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, zunächst das genaue Expressionsprofil eines

Promotors im heterologen System zu analysieren, wenn ein Einsatz dieses Promotors in diesem System für die Expression von Genen beabsichtigt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil von fünf Promotoren aus der Zuckerrübe in Tabak und in der Zuckerrübe miteinander verglichen. Zuckerrübe und Tabak sind nur entfernt miteinander verwandt, da die Zuckerrübe zur Familie der *Chenopodiaceae* und Tabak zur Familie der *Solanaceae* gehört (Strasburger, 1998).

Im folgenden werden die Expressionsprofile der einzelnen Promotoren in der Zuckerrübe und in Tabak miteinander verglichen. Sofern sich aufgrund des Expressionsprofils Rückschlüsse auf eine spezifische Funktion der Gene ergeben, die von den untersuchten Promotoren in der Zuckerrübe reguliert werden, werden diese diskutiert.

4.1.1.1 Der Promotor von BvTlp1 weist in Tabak und in der Zuckerrübe ein sehr ähnliches Expressionsprofil auf

Die Expressionsprofile des BvTlp1 Promotors in der Zuckerrübe bzw. in Tabak stimmen gut miteinander überein. In der Zuckerrübe wird der Promotor spezifisch in der Rübe in dem Gewebe exprimiert, das das Xylem umgibt (Abb. 5). In diesem Bereich befindet sich das Xylemparenchym. Auch in Tabak ist die Promotoraktivität mit dem Transportgewebe der Wurzel assoziiert. Es wurde eine GUS-Aktivität des Promotor-Reportergenkonstruktes im Zentralzylinder der Tabakwurzel, nicht aber im Rindengewebe nachgewiesen (Abb. 19b).

In der Zuckerrübe vermittelt der BvTlp1 Promotor in der gesamten Wurzel im Begleitgewebe des Xylems eine, verglichen mit den vier übrigen untersuchten Promotoren, relativ starke Expression des Reportergens (Abb. 4. und Abb. 5). Im Blatt ist der Promotor verglichen mit dem Wildtyp kaum aktiv (Abb. 4). In Tabak ist der Promotor zwar nur sehr schwach aktiv, jedoch vermittelt er eine gewebespezifische Expression im Hypokotyl und in der Wurzel (Abb. 18 und Abb. 19a). Die Beobachtung, dass der BvTlp1 Promotor in Tabak im Hypokotyl und in der Wurzel aktiv ist, ist insofern interessant, weil die Wurzel der Zuckerrübe aus diesen beiden Geweben hervorgeht: aus dem Hypokotyl und der Primärwurzel des Keimlings (siehe Einleitung). Somit könnte der BvTlp1 Promotor in Tabak und in der Zuckerrübe hinsichtlich der gewebespezifischen Expression im Hypokotyl und in der Wurzel ein übereinstimmendes Expressionsprofil zeigen. Um dazu allerdings eindeutigere Aussagen machen zu können, müssen die Ergebnisse der Analyse der ersten Nachfolgegeneration der transgenen Zuckerrüben abgewartet werden, da im Rahmen der Expressionsanalyse lediglich Zuckerrüben eingesetzt worden sind, die vegetativ vermehrt worden und nicht aus Samen aufgegangen sind (Kap. 3.1.1). Die untersuchten Rüben wiesen deshalb keinen aus dem Hypokotyl hervorgegangenen Bereich auf.

Die sehr ähnlichen histochemischen Expressionsprofile des BvTlp1 Promotors in Tabak und in der Zuckerrübe deuten darauf hin, dass die für die Regulation notwendigen

Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren in beiden Pflanzen relativ konserviert sind. Die sehr schwache Expression in Tabak könnte jedoch bedeuten, dass die für die Regulation des BvTlp1 Promotors verantwortlichen *cis* und *trans* Faktoren in Tabak nicht sehr effektiv interagieren.

4.1.1.1.1 Das Genprodukt von BvTlp1 spielt vermutlich bei der konstitutiven Abwehr von Pathogenen eine Rolle

Das spezifische Expressionsprofil von BvTlp1 ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktion des Gens, das dieser Promotor in der Zuckerrübe reguliert. Der BvTlp1 Promotor reguliert in der Zuckerrübe die Expression eines Thaumatin-Like-Proteins (TLP, siehe Einleitung).

Die Bezeichnung „Thaumatin-Like“ für die Proteinfamilie der TLPs geht auf eine Homologie auf Aminosäureebene zu Thaumatin zurück, einem süß schmeckendem Protein aus der Frucht von *Thaumatococcus daniellie* (Vigers *et al.*, 1991). Thaumatin-Like Proteine gehören zur Familie 5 der Pathogenesis-Related-Proteine (PR-Proteine). Dabei handelt es sich um von Pflanzen exprimierte Proteine, die in der Pathogenabwehr eine wichtige Rolle spielen. Ihre Expression wird in der Regel durch den Befall von Pathogenen wie Pilze, Bakterien oder Viren induziert. Eine Induktion kann aber auch durch abiotische Faktoren erfolgen (Kitajima und Fumihiko, 1999).

Thaumatin-Like Proteine, die wie die übrigen PR-Proteine durch zahlreiche biotische und abiotische Faktoren induziert werden können (Vigers *et al.*, 1991), weisen eine antifungale Wirkung auf, die darauf beruht, dass sie die Zellwände von Pilzen permeabilisieren können (Hejgaard *et al.*, 1991; Roberts und Selitrennikoff, 1990). Wie andere PR-Proteine werden Thaumatin-Like Proteine in eine saure und eine basische Unterklasse unterteilt, die sich in der Regel hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle unterscheiden. Die basischen PR-Proteine werden meist in die Vakuole transportiert, während die sauren in den extrazellulären Raum sekretiert werden (Kitajima und Fumihiko, 1999). Einige basische PR-5-Proteine werden in einigen pflanzlichen Organen wie z. B. der Wurzel, dem Samen oder der Infloreszenz konstitutiv exprimiert und haben deshalb eine potentielle Funktion in der vorbeugenden Abwehr von Pathogenen (Kitajima und Fumihiko, 1999). Beispielsweise wird das PR-5 Protein Osmotin, ein naher Verwandter der Thaumatin-Like Proteine, in nicht infizierten Tabakpflanzen in der Wurzel, nicht aber in anderen Geweben exprimiert. In anderen Geweben ist die Expression von Osmotin induzierbar (Koiwa, 1997).

Aufgrund der konstitutiven Expression im Begleitgewebe des Xylems, im Xylemparenchym, könnte auch das Genprodukt von BvTlp1 eine Funktion in der vorbeugenden Abwehr von Pathogenen haben. Es hat einen theoretischen pI-Wert von 8,44 (Kloos *et al.*, 2002, berechnet aus der Aminosäuresequenz von BvTlp1). Damit ist es, übereinstimmend mit den

übrigen konstitutiv exprimierten PR-Proteinen, vermutlich ein basisches PR-Protein. Jedoch könnte der tatsächliche pI-Wert aufgrund von posttranslationalen Modifikationen vom theoretischen pI-Wert abweichen.

Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung eine konstitutive Expression eines PR-Proteins im Xylemparenchym einer Pflanze haben könnte. Das Xylemparenchym umgibt das Xylem, das in Pflanzen für die Versorgung der Pflanzen mit Wasser und Mineralstoffen verantwortlich ist (Rep *et al.*, 2002). Aufgrund seiner Struktur ist das Xylem jedoch auch ein Bereich, der von Pathogenen befallen werden kann. Zahlreiche Gefäßpathogene wie *Fusarium oxysporum* nutzen das Xylem für die Ausbreitung innerhalb der Pflanze (Rep *et al.*, 2002, Tjamos und Beckmann, 1989).

Obwohl es in der Literatur zahlreiche Studien über PR-Proteine gibt, ist noch nicht viel über die genauen Mechanismen der Pathogenabwehr im Xylem bekannt. Rep *et al.* (2002) zeigten durch massenspektrometrische Analysen von Xylemflüssigkeit, dass in der Xylemflüssigkeit der Tomate nach einer Infektion mit dem Gefäßpathogen *Fusarium oxysporum* der Gehalt von zahlreichen Proteinen, die in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen, erhöht war. Die Autoren vermuten, dass diese Proteine vom Xylemparenchym in das Xylem sekretiert werden. Übereinstimmend damit gibt es in der Literatur einige Beispiele, dass an der Pathogenabwehr beteiligte Proteine spezifisch im Xylemparenchym bzw. in den vaskulären Bereichen exprimiert werden. Beispielsweise wurde für ein Pathogenabwehrgen gegen *Fusarium oxysporum* eine spezifische, wenn auch schwache Expression im Xylemparenchym nachgewiesen (Mes *et al.*, 2000). Weiterhin zeigten Ito *et al.* (2002), dass zwei an der Abwehr von Pathogenen beteiligte Peroxidase-Gene in Reis im Xylemparenchym exprimiert werden.

Überraschenderweise wird das Genprodukt von BvTlp1 vermutlich nicht wie die meisten basischen PR-Proteine in die Vakuolen transportiert, da es über kein Signalpeptid für den Transport in die Vakuole verfügt. Vielmehr deuten *in silico* Analysen der aminoterminalen Peptidsequenz darauf hin, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Apoplasten sekretiert wird (Oltmanns und Hehl, nicht veröffentlicht). Dies könnte bedeuten, dass BvTlp1 im Xylemparenchym der Zuckerrübe eine Funktion in der konstitutiven Abwehr von Pathogenen übernimmt, die sich wie *Fusarium oxysporum* f. sp. *Betae* (Harveson und Rush, 1997) über das Xylem in der Zuckerrübe ausbreiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Promotor nicht auf eine Induzierbarkeit durch biotische oder abiotische Faktoren untersucht. Jedoch deutet eine Analyse der Promotorsequenz darauf hin, dass BvTlp1 wie andere basische, konstitutiv exprimierte Gene durch äußere Faktoren induziert werden kann (Hehl *et al.*, 2004). Neben zahlreichen wurzelspezifischen Motiven (ATATT-Boxen, Elmayan und Tepfer, 1995) enthält der Promotor einige *cis*

Elemente, die auf eine Pathogeninduzierbarkeit des Promotors hindeuten. Bei diesen Elementen handelt es sich um zwei W-Boxen (TTGACC bzw. TTGAC) sowie eine PalA-Box (Logemann *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002). Die Anwesenheit von pathogeninduzierbaren Elementen im Promotor könnte bedeuten, dass der Promotor nach Induktion durch Pathogenbefall erstens im Xylemparenchym stärker exprimiert werden könnte als unter nicht infizierten Bedingungen und zweitens auch in anderen Geweben aktiv sein könnte.

4.1.1.2 Die Expressionsprofile des BvMII Promotors in Tabak und in der Zuckerrübe sind ähnlich

Der BvMII Promotor reguliert in der Zuckerrübe die Expression eines Major-latex-like Proteins, dessen genaue Funktion nicht bekannt ist (Kloos *et al.*, 2002). Er bewirkt in Tabak und in der Zuckerrübe jeweils ein sehr ähnliches Expressionsprofil. In der Zuckerrübe vermittelt der BvMII Promotor eine starke Reportergenexpression in der Wurzel. Im Blatt ist, verglichen mit der nichttransgenen Kontrolle, kaum Aktivität nachweisbar (Abb. 8). Im histochemischen Assay wurde nachgewiesen, dass der Promotor in Parenchym der gesamten Rübe aktiv ist (Abb. 9). Besonders stark scheint der Promotor in den vaskulären Bereichen der Zuckerrübenwurzel aktiv zu sein (Abb. 9c). Diese Bereiche bestehen aus Xylem- und Phloemgewebe sowie zu einem großen Teil aus parenchymatischem Gewebe (siehe Einleitung). Quantitative GUS-Analysen für Tabakpflanzen, die ein BvMII Promotor-Reportergenkonstrukt tragen, zeigen, dass der Promotor im Hypokotyl und in der Wurzel relativ stark exprimiert wird und kaum im Blatt (Abb. 16). Histochemische Assays bestätigen diese Ergebnisse, jedoch wurde auch eine Reportergenaktivität im Leitgewebe des Blattes nachgewiesen (Abb. 17). In der Wurzel ist der Promotor im Zentralzylinder und in der Rinde aktiv; im Zentralzylinder wird eine scheinbar höhere Aktivität als in der Rinde beobachtet (Abb. 17b).

Der Vergleich der Expressionsprofile von BvMII in Tabak und in der Zuckerrübe zeigt, dass der BvMII Promotor in beiden Pflanzen relativ stark in der Wurzel exprimiert wird. Sowohl in Tabak als auch in der Zuckerrübe ist der Promotor in der Wurzel in den parenchymatischen Bereichen aktiv, am stärksten scheint er in beiden Pflanzen in den vaskulären Bereichen bzw. im Zentralzylinder der Wurzel aktiv zu sein (Abb. 9c und Abb. 17b). Wie der BvTlp1 Promotor (Kap. 4.1.1.1) und der BvSmp Promotor (Kap. 4.1.1.5) wird der BvMII Promotor in Tabak im Hypokotyl und in der Wurzel exprimiert, also in den beiden Geweben, aus denen die Rübe der Zuckerrübe hervorgeht (vergl. Kap. 4.1.1.1).

Der Promotor von BvMII vermittelt wie BvTlp1 in der Zuckerrübe und Tabak ein sehr ähnliches Expressionsprofil. Dies bedeutet, dass die Faktoren, die in Tabak und in der Zuckerrübe für die Expression des BvMII Promotors verantwortlich sind, in beiden Pflanzen vermutlich konserviert sind.

4.1.1.3 Die Expressionsprofile von BvHis1-r in der Zuckerrübe und in Tabak stimmen nur teilweise überein und unterscheiden sich von dem quantitativen Expressionsprofil des BvHis1-r Homologs aus *Arabidopsis thaliana*

Der Promotor von BvHis1-r reguliert in der Zuckerrübe die Expression eines Linker-Histons (siehe Einleitung, Kloos *et al.*, 2002). Die Expressionsprofile von BvHis1-r in Tabak und in der Zuckerrübe stimmen nur teilweise überein. Zwar vermittelt der Promotor in beiden Pflanzen in allen untersuchten Geweben eine Expression, jedoch wird der BvHis1-r Promotor im Blattgewebe von Zuckerrüben deutlich weniger stark als in der Wurzel exprimiert, während er im Tabakblättern ähnlich stark wie in der Wurzel und im Hypokotyl exprimiert wird (Abb. 6 und Abb. 22). Weitere Unterschiede gibt es hinsichtlich des histochemischen Expressionsprofils in der Wurzel der beiden Pflanzen. In der Wurzel bzw. der Rübe der Zuckerrübe zeigt der BvHis1-r Promotor im Begleitgewebe des Xylems die stärkste Aktivität, in den übrigen Bereichen der Rübe vermittelt er nur eine sehr schwache Expression (Abb. 7d). In der Tabakwurzel hingegen ist der Promotor mit Ausnahme der Wurzelhaare in der gesamten Wurzel stark aktiv (Abb. 23b).

Interessant ist der Vergleich der Aktivität des BvHis1-r Promotors (Abb. 6) mit der Aktivität des AtHis1-3 Promotors aus *Arabidopsis thaliana* im jeweils homologen System (Abb. 26). Die von den beiden Promotoren regulierten Gene sind zueinander homolog, es handelt sich jeweils um eine „kleinere“ (minor) Linker-Histon Variante (siehe Einleitung). In der Wurzel scheint die Aktivität der beiden Promotoren mit dem Leitsystem assoziiert zu sein. Der BvHis1-r Promotor vermittelt die oben beschriebene Expression im Begleitgewebe des Xylems (Abb. 7), und der Promotor von AtHis1-3 ist im Zentralzylinder aktiv (Abb. 25b). Unterschiede weisen die Expressionsprofile der beiden Promotoren hinsichtlich der quantitativen Reporterexpression von Blatt und Wurzel auf. Während AtHis1-3 in *Arabidopsis thaliana* signifikant stärker im Blatt als in der Wurzel aktiv ist, vermittelt BvHis1-r in der Zuckerrübe in der Wurzel eine deutlich höhere Reporterexpression als im Blatt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Promotoren in ihrem jeweiligen System voneinander abweichende Funktionen erfüllen.

4.1.1.4 Der Promotor von BvTlp2 weist in Tabak und in der Zuckerrübe jeweils ein unterschiedliches Expressionsprofil auf

Der Promotor von BvTlp2 reguliert wie der Promotor von BvTlp1 in der Zuckerrübe die Expression eines Thaumatin-Like Proteins (Kloos *et al.*, 2002, Kap. 4.1.1.1.1).

Die Expressionsprofile des Promotors von BvTlp2 in Tabak und in der Zuckerrübe sind unterschiedlich. Überraschenderweise vermittelt der Promotor in Tabak eine gewebespezifische Expression, während die Expression in der Zuckerrübe sehr uneinheitlich ist. In der Zuckerrübe wurden sowohl im Blatt als auch in der Wurzel relativ hohe

Luciferasewerte gemessen (Abb. 12). Dabei war das Verhältnis der quantitativen Luciferase-Werte im Blatt- und im Wurzelgewebe teilweise recht uneinheitlich. In einigen der untersuchten Linien war die Reportergenaktivität im Blatt höher als in der Wurzel, in anderen verhielt es sich umgekehrt.

In Tabak wird der BvTlp2 Promotor sehr stark und sehr spezifisch in den Wurzelhaaren und der Epidermis exprimiert. Im Hypokotyl bzw. im Blatt war im quantitativen Assay nur eine sehr geringe Reportergenaktivität nachweisbar (Abb. 20 und Abb. 21). Histochemische LUC-Analysen wurden mit Zuckerrüben, die ein BvTlp2 Promotor-Reporterkonstrukt tragen, aufgrund der Uneinheitlichkeit des beobachteten quantitativen Expressionsprofils nicht durchgeführt (Kap. 3.1.1.5). Deshalb kann auch keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Promotor in der Zuckerrübe in den Wurzelhaaren bzw. der Wurzelepidermis aktiv ist.

Da es sich bei dem von dem BvTlp2 Promotor regulierten Gen um ein Thaumatin-Like Protein handelt, also vermutlich um ein Protein, das durch biotische bzw. abiotische Faktoren induzierbar ist, ist es nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen Expressionsprofile in Tabak und in der Zuckerrübe dadurch verursacht wurden, dass die Pflanzen jeweils unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden. Die transgenen Tabakkeimlinge wurden unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium angezogen. Die Zuckerrüben hingegen wurden auf Erde kultiviert. Somit wurden die transgenen Zuckerrüben im Gegensatz zu den untersuchten Tabakkeimlingen in einer Umgebung kultiviert, in der es einen ständigen Kontakt mit Pathogenen gibt. Dies könnte zu einer Induktion des Promotors führen und somit eventuell das zum Tabak abweichende Expressionsprofil bewirken. Allerdings wurde die Induktion von BvTlp2 durch äußere Faktoren nicht untersucht. Ein Indiz dafür, dass BvTlp2 durch äußere Faktoren induzierbar ist, sind die mit transgenen Tabakkeimlingen durchgeführten histochemischen GUS-Assays. Im Rahmen der histochemischen Analyse wurde neben der oben beschriebenen spezifischen Blaufärbung der Wurzelhaare bzw. der Wurzelepidermis noch an einigen Keimlingen eine unspezifische, uneinheitliche Blaufärbung im Bereich des Hypokotyls bzw. in einzelnen Blättern beobachtet (Abb. 21a, 35d). Diese Blaufärbung könnte durch eine Form von Wundinduktion hervorgerufen worden sein, da die Keimlinge vor Durchführung der quantitativen GUS-Assays ungefähr in diesen Bereichen mit einer Pinzette aus dem Medium gezogen worden waren. Dies könnte bedeuten, dass der Promotor von BvTlp2 in Tabak konstitutiv in den Wurzelhaaren und der Epidermis exprimiert wird, aber in anderen Geweben induziert werden kann. Diese Vermutung stimmt damit überein, dass BvTlp2 wie BvTlp1 vermutlich ein basisches PR-Protein ist (Kloos und Hehl, pers. Mitteilung) und diese in bestimmten Geweben konstitutiv exprimiert werden können. Zudem sind sie in der Regel durch äußere Faktoren induzierbar (siehe oben, Kitajima und Fumihiko, 1999).

4.1.1.4.1 Ist das Genprodukt von BvTlp2 an der konstitutiven Pathogenabwehr in den Wurzelhaaren bzw. der Wurzelepidermis beteiligt?

Die Wurzelepidermis und die Wurzelhaare, bei denen es sich um Verlängerungen von Epidermiszellen handelt, spielen bei der Aufnahme von Wasser und Nährstoffen eine wichtige Rolle (Potenza *et al.*, 2004). Es sind die Bereiche einer Pflanze, die in direktem Kontakt mit der Erde stehen. Damit sind sie kontinuierlich den im Boden vorkommenden Pathogenen ausgesetzt (Bucher, 2002). In der Literatur finden sich wenige Daten über die Expression von PR-Proteinen in Wurzelhaaren. Mylona *et al.* (1994) zeigten, dass in der Erbse das Gen RH2, ein Homolog zu PR-Proteinen, in nicht infizierten Wurzelhaaren bzw. Wurzelepidermiszellen exprimiert wird. Die Autoren vermuten, dass RH2 an einer konstitutiven Abwehr von Pathogenen in der Wurzelepidermis bzw. in den Wurzelhaaren beteiligt ist. Eine konstitutive Expression eines PR-Proteins in den Wurzelhaaren und der Wurzelepidermis ist für die Pflanze sinnvoll, weil Pathogene gleichzeitig mit dem Zeitpunkt ihres Befalls abgewehrt werden könnten und die Expression von Pathogenabwehrgenen nicht erst induziert werden muss. Weiterhin wird durch die gewebespezifische, kontinuierliche Expression eines PR-Gens weniger Energie aufgewendet, als wenn das PR-Protein auch in Geweben exprimiert werden würde, in denen es nicht benötigt wird (Heil und Baldwin, 2002). Dadurch hätten Pflanzen, die ein PR-Protein nur spezifisch in dem Gewebe exprimieren, in dem es benötigt wird, gegenüber Pflanzen, die ein PR-Protein in der gesamten Pflanze konstitutiv exprimieren, einen Selektionsvorteil.

Die Frage, ob das Genprodukt von BvTlp2 in der Zuckerrübe eine Rolle in der Pathogenabwehr in den Wurzelhaaren spielt, kann noch nicht beantwortet werden. Die gewebespezifische Expression in den Wurzelzellen bzw. in den Wurzelhaaren wurde nur im heterologen System Tabak beobachtet. In Zuckerrüben vermittelt der BvTlp2 Promotor, wenn die Zuckerrüben auf Erde kultiviert werden, jedoch eine Aktivität in Blatt- und in Wurzelgewebe. Nähere Aussagen über eine mögliche Funktion des Genproduktes von BvTlp2 in der konstitutiven Pathogenabwehr können erst nach Analysen der ersten transgenen Nachfolgegeneration gemacht werden, wenn untersucht worden ist, ob der Promotor in den Wurzelhaaren bzw. in der Wurzelepidermis aktiv ist.

4.1.1.5 Die Reportergenexpression von BvSmp ist sowohl in der Zuckerrübe als auch in Tabak mit den Transportgefäßen der Wurzel assoziiert

Das potentielle Genprodukt von BvSmp hat ein 92 Aminosäuren langes offenes Leseraster, zeigt aber keine Homologien zu Genen mit bekannter Funktion.

Das Expressionsprofil des BvSmp Promotors in der Zuckerrübe ist nicht einheitlich. Drei der untersuchten BvSmp-Promotor-Reportergenlinien exprimieren die Luciferase blattspezifisch, sechs Linien exprimieren das Reportergen wurzelspezifisch (Abb. 10). Zum jetzigen

Zeitpunkt ist es nicht möglich, Gründe für dieses sehr uneinheitliche Expressionsprofil in der Zuckerrübe zu benennen. Die beobachteten Unterschiede könnten evtl. auf Positionseffekte sowie auf epigenetische Silencing-Effekte zurückzuführen sein (Matzke und Matzke, 1998). Nähere Aussagen können jedoch erst gemacht werden, wenn Southern-Blot-Analysen mit Pflanzen der ersten transgenen Nachfolgeneration durchgeführt worden sind und die Kopienzahl der T-DNA-Insertionen bestimmt worden ist.

In Tabak exprimiert das BvSmp GUS-Konstrukt das Reportergen, verglichen mit dem CaMV 35S Promotor, nur sehr schwach, jedoch zeigt der Promotor eine Spezifität für die Wurzel bzw. für das Hypokotyl (Abb. 13). Im Blatt wird das Reportergen wesentlich schwächer als in Wurzel und Hypokotyl exprimiert (Abb. 13). In der Wurzel ist der Promotor im Zentralzylinder aktiv (Abb. 15b). Damit ähnelt das Expressionsprofil von BvSmp in Tabak dem Expressionsprofil der transgenen Zuckerrübenlinien, die das Reportergen blattspezifisch exprimieren. In diesen Linien wurde eine mit den Transportgefäßen assoziierte Promotoraktivität beobachtet (Abb. 11).

Der Promotor von BvSmp vermittelt wie der BvTlp1 und der BvMII Promotor (Kap. 4.1.1.1 und Kap. 4.1.1.2) in Tabak eine gewebespezifische Expression im Hypokotyl und der Wurzel. Da die Wurzel der Zuckerrübe aus dem Hypokotyl bzw. der Primärwurzel des Keimlings hervorgeht, könnte das Expressionsprofil des BvSmp Promotors in beiden Pflanzen vergleichbar sein. Nähere Aussagen über die Vergleichbarkeit des Expressionsprofils von BvSmp werden nach Analyse von aus Samen aufgegangenen transgenen Zuckerrüben mit dem BvSmp Promotor-LUC Konstrukt möglich sein (vergl. Kap. 4.1.1.1).

Der Promotor von BvSmp zeigt in Tabak und der Zuckerrübe teilweise übereinstimmende Expressionsprofile. Dies bedeutet, dass in beiden Pflanzen vermutlich einige der Elemente, die den BvSmp Promotor in *cis* und in *trans* regulieren, konserviert sein könnten. Um diese Vermutung allerdings eindeutiger zu bestätigen, müssen unter anderem die Ergebnisse der noch ausstehenden Experimente mit der ersten transgenen Nachfolgeneration abgewartet werden (siehe oben).

4.1.2 Biotechnologische Anwendbarkeit der untersuchten Promotoren

Für die Herstellung von transgenen Nutzpflanzen ist die Wahl des Promotors, der die Expression des Transgens reguliert, von besonderer Bedeutung (Potenza *et al.*, 2004). Die Expressionsanalyse von fünf Promotoren aus der Zuckerrübe erfolgte auch unter dem Gesichtspunkt, ob sich die Promotoren für eine wurzelspezifische Expression von ausgewählten Genen in transgenen Pflanzen eignen. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob die Promotoren tatsächlich gewebespezifisch exprimiert werden, in welchem

Gewebe der Wurzel sie exprimiert werden sowie wie stark sie exprimiert werden. Die Beantwortung dieser Fragen ist wichtig, um über mögliche Anwendungen der Promotoren in transgenen Zuckerrüben oder in anderen transgenen Pflanzen entscheiden zu können.

Für eine wurzelspezifische Expression von Transgenen in der Zuckerrübe sind aufgrund ihres Expressionsprofils vor allem zwei der fünf untersuchten Promotoren geeignet: Der Promotor von BvTlp1 und der Promotor von BvMII. Beide Promotoren werden sehr spezifisch in der Wurzel jeweils in unterschiedlichen Geweben der Zuckerrübe exprimiert und nicht im Blatt. Der BvTlp1 Promotor wird sehr spezifisch im Begleitgewebe des Xylems exprimiert, während der BvMII Promotor über den gesamten Querschnitt der Wurzel aktiv ist (Abb. 5, Abb. 9). Diese verschiedenen Expressionsprofile der beiden Promotoren sind insofern ideal, da sich deshalb die Promotoren für unterschiedliche Anwendungen eignen und somit ein breites Spektrum an wurzelspezifischen Anwendungen abdecken können.

Die drei übrigen untersuchten Promotoren scheinen weniger für die wurzelspezifische Expression von Genen in der Zuckerrübe geeignet zu sein als der BvMII und der BvTlp1 Promotor. Der Promotor von BvHis1-r scheint weniger geeignet zu sein, da sein Expressionsprofil nicht spezifisch genug ist. Er wird zwar stärker in der Wurzel als im Blatt exprimiert, weist aber dennoch auch im Blatt eine Expression des Reportergens auf (Abb. 6). Der Promotor von BvSmp zeigt ein uneinheitliches Expressionsprofil, jedoch exprimieren die meisten untersuchten Linien das Reportergen gewebespezifisch in der Wurzel (Abb. 10). Dies bedeutet, dass sich der Promotor für eine wurzelspezifische Expression von Genen eignen könnte. Um diesen Promotor für eine wurzelspezifische Expression einsetzen zu können, müssten jedoch nach der Herstellung von transgenen Pflanzen zunächst diejenigen Linien identifiziert werden, die das jeweils mit dem Promotor fusionierte Gen wurzelspezifisch exprimieren. Der Promotor BvTlp2 zeigte ebenfalls in der Expressionsanalyse ein sehr uneinheitliches Expressionsverhalten in der Zuckerrübe und wird sowohl im Blatt als auch in der Wurzel exprimiert (Abb. 12). Deshalb ist er für eine gewebespezifische Expression von Genen in der Zuckerrübe wenig geeignet. Interessanterweise zeigt der Promotor von BvTlp2 in Tabak eine sehr spezifische Expression in den Wurzelhaaren bzw. in der Wurzelepidermis. Deshalb könnte er in Tabak und eventuell in anderen Pflanzen für eine gewebespezifische Expression geeignet sein.

In den folgenden Kapiteln werden Einsatzmöglichkeiten der charakterisierten Promotoren diskutiert.

4.1.2.1 Der BvMII-Promotor könnte sowohl für das Molecular Farming als auch für die Optimierung von transgenen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen eingesetzt werden

Das BvMII Promotor-Reportergenkonstrukt weist in der Zuckerrübe, verglichen mit den vier anderen untersuchten Promotoren, für die Wurzel das spezifischste Expressionsprofil auf (Abb. 8 und Abb. 9). Aufgrund der von ihm vermittelten relativ starken Expression in den parenchymatischen Bereichen der Rübe, eignet er sich besonders für die Fusionierung mit Genen, die Modifikationen im Saccharose-Metabolismus bewirken. Vorstellbar sind Einsatzmöglichkeiten sowohl in der Optimierung von transgenen, landwirtschaftlichen Nutzpflanzen als auch im Molecular Farming.

Eine mögliche Anwendung des BvMII Promotors für die Optimierung von transgenen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen könnte die Reduzierung von wirtschaftlich unerwünschten Zuckerverlusten sein.

In der vegetativen Wachstumsphase von Zuckerrüben (im ersten Jahr) wird nicht nur Saccharose in der Wurzel gespeichert, sondern es gibt auch einen gegenläufigen Effekt. Ein Teil der eingelagerten Saccharose wird metabolisiert (Klotz und Campbell, 2003). Weiterhin verlieren Zuckerrüben, die nach der Ernte gelagert werden, täglich ca. 0,1 % ihres absoluten Saccharosegehaltes (Quelle Südzucker, siehe Einleitung). Gleichzeitig werden mit dem Abbau der Saccharose die Abbauprodukte Glucose und Fructose, die für die technische Aufarbeitung der Rüben nicht erwünscht sind, angehäuft.

Drei Enzymfamilien sind verantwortlich für nahezu den gesamten Abbau von Saccharose in der Wurzel der Zuckerrübe: saure Invertasen, basische Invertasen sowie Sucrose-Synthasen (Klotz und Campbell, 2003). Der Einfluss dieser einzelnen Enzymfamilien auf den Saccharosegehalt der Zuckerrübe ist jedoch noch nicht genau bekannt.

Der BvMII Promotor könnte eingesetzt werden, um den Abbau der Saccharose während des Wachstums und, vorausgesetzt der Promotor ist auch in gelagerten Rüben aktiv, während der Lagerung nach der Ernte zu reduzieren. Ein Ansatzpunkt zur Reduzierung des Zuckerverlustes ist, dass die Aktivität von Invertasen durch Invertase-Inhibitoren gehemmt werden kann (Rausch und Greiner, 2004).

Um den Abbau von Zucker in der Wurzel der Zuckerrübe zu reduzieren, könnte der BvMII Promotor mit einem Gen für einen Invertase-Inhibitor fusioniert werden und stabil in die Zuckerrübe transformiert werden. Da der Promotor Aktivität im Speicherparenchym der Wurzel vermittelt, würde der Invertase-Inhibitor in dem Gewebe exprimiert werden, in dem die Degradation der eingelagerten Saccharose verhindert werden soll. Die gewebespezifische Expression könnte die Möglichkeit des Auftretens von unerwünschten Effekten auf den Phänotyp reduzieren, die eine konstitutive Expression des Inhibitors haben

könnte. Allerdings muss zunächst untersucht werden, ob nicht schon die gewebespezifische Modifikation des Saccharose-Stoffwechsels einen negativen Effekt auf den Phänotyp der transgenen Pflanzen hat.

Aufgrund seines Expressionsprofils ist der BvMII Promotor für unterschiedliche Molecular-Farming-Ansätze geeignet. Der BvMII Promotor könnte beispielsweise in transgenen Pflanzen für die Herstellung von Palatinose eingesetzt werden. Palatinose (6-O-alpha-D-glucopyranosyl-D-fructose), auch bezeichnet als Isomaltulose, ist ein Strukturisomer der Saccharose und hat ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften. Palatinose ist nicht kariogen, da die im Mund vorkommenden Streptococcen die Palatinose nicht metabolisieren können. Weiterhin hat es weniger Kalorien als Saccharose (Börnke et al., 2002a). Aufgrund dieser Eigenschaften wird Palatinose in der Nahrungsmittelindustrie als Ersatzstoff für Saccharose für die Herstellung zahlreicher zahnfreundlicher und kalorienreduzierter Lebensmittel eingesetzt. Im industriellen Maßstab wird Palatinose bisher in Bioreaktoren hergestellt, in denen immobilisierte Mikroorganismen wie *Protaminobacter rubrum* die Umsetzung von Saccharose zu Palatinose katalysieren (Börnke et al., 2002a). Jedoch ist der Einsatz von Bioreaktoren mit einem erheblichen technischen und finanziellen Aufwand verbunden (Lessard et al., 2002). Eine mögliche Alternative ist daher die Synthese von Palatinose in Pflanzen. Börnke et al. (2002a) stellten Palatinose in transgenen Kartoffeln her. Für die Palatinose-Synthese wurde ein Gen für eine Sucrose-Isomerase aus *Erwinia rhapontici* mit einem knollenspezifischen Promotor fusioniert und stabil *in planta* transformiert. Der Einsatz eines Promotors, der eine konstitutive Expression vermittelt, hatte sich zuvor als nachteilig erwiesen, da die transgenen Pflanzen einen unerwünschten Phänotyp aufwiesen (Börnke, 2002b).

Die Wurzel der Zuckerrübe könnte als pflanzlicher Bioreaktor besser als die Kartoffel für die Produktion von Palatinose geeignet sein, da in der Wurzel im Vergleich zur Kartoffelknolle das Substrat für die Isomerisierung, die Saccharose, in einer sehr hohen Konzentration vorliegt (siehe Einleitung). Als Promotor scheint der BvMII Promotor aufgrund seines Expressionsprofils ideal geeignet zu sein. Er wird im parenchymatischen Gewebe in der Zuckerrübe exprimiert, also in dem Gewebe, in dem die Saccharose gespeichert ist. Durch die gewebespezifische Expression könnten unerwünschte Effekte, wie sie in der Kartoffel bei der Verwendung des CaMV 35S Promotors beobachtet wurden, vermieden werden. Da der BvMII Promotor im Vergleich mit den übrigen untersuchten Promotoren relativ stark aktiv ist, können hohe Produktausbeuten erwartet werden. Ein weiteres Argument, dass der BvMII Promotor sehr gut für einen Molecular-Farming-Ansatz hinsichtlich der Synthese von Palatinose geeignet ist, ist die Beobachtung, dass der Promotor scheinbar im

Parenchymgewebe der vaskulären Bereiche, wo die Saccharosekonzentration innerhalb der Rübe am höchsten ist, am stärksten exprimiert wird (Abb. 9).

Die Verwendung des BvMII Promotors für die Herstellung von Palatinose ist nur eine Einsatzmöglichkeit des Promotors im Molecular Farming. Der Promotor könnte beispielsweise auch dafür eingesetzt werden, um in der Zuckerrübe Fructane herzustellen. Sevenier *et al.* (1999) zeigten, dass die Produktion von Fructanen in der Zuckerrübe ohne negative Eigenschaften auf das Wachstum der Pflanze möglich ist. Fructane sind Fructose-Polymere und von wirtschaftlichen Interesse, da sie in Nahrungsmitteln entweder hochkalorige Süßstoffe (z. B. Saccharose) oder Fette ersetzen können. Kurzkettige Fructane schmecken süß. Sie können vom menschlichen Verdauungssystem nicht abgebaut werden und sind deshalb für die Herstellung diätischer Nahrungsmittel geeignet. Das gleiche trifft auch für länger-kettige Fructane zu, die fett-ähnliche Emulsionen bilden (Granger, 2000). Für die Herstellung von Fructanen müsste der BvMII Promotor mit Genen pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs fusioniert werden, die die Synthese von Fructanen katalysieren. Dies könnten beispielsweise eine 1-Sucrose-Sucrose-Fructosyl-Transferase (1-SST) und eine 1-Fructan-Fructan-Fructosyl-Transferase (1-FFT) sein. Die 1-SST katalysiert die Synthese von kurzkettigen Fructanen aus Saccharose, die 1-FFT die Synthese von länger-kettigen Fructanen (van den Ende und van Laere, 1996).

4.1.2.2 Der Promotor von BvTlp1 eignet sich für die Expression von Genen in der Zuckerrübe, die einen Einfluss auf die Pathogenabwehr sowie auf Transportprozesse im Xylemparenchym haben

Der BvTlp1-Promotor wird gewebespezifisch im Xylemparenchym der Zuckerrübenwurzel exprimiert (Abb. 5). Im Blatt war im Rahmen der Expressionsanalyse quantitativ nur eine sehr schwache Expression des Reportergens nachweisbar (Abb. 4). Aufgrund seiner spezifischen Expression im Xylemparenchym sind unterschiedliche biotechnologische Anwendungen für den BvTlp1 Promotor in transgenen Nutzpflanzen, jedoch eher nicht im Molecular Farming vorstellbar.

Bei dem Xylemparenchym handelt es sich um das Gewebe, das die Xylemstränge umgibt. Es hat eine Funktion in der spezifischen Be- und Entladung des Xylems (Okumoto *et al.*, 2002). Der BvTlp1 Promotor könnte beispielsweise eingesetzt werden, um die Stofftransportprozesse zwischen Xylem und Xylemparenchym zu modifizieren. Weiterhin eignet er sich für die Expression von Pathogenabwehrgenen gegen Gefäßpathogene wie *Fusarium oxysporum* f. sp. *Betae*, die sich über das Xylem in der Pflanze ausbreiten. Dieser Ansatz entspricht vom Prinzip her der vermuteten biologischen Funktion von BvTlp1 (Kap. 4.1.1.1). Die gewebespezifische Expression eines Pathogenabwehrgens würde

mögliche unerwünschte Effekte verhindern, die eine konstitutive Expression des Pathogenabwehrgenes in der gesamten Pflanze haben könnte. Beispielsweise zeigten Heil und Baldwin (2002), dass eine konstitutive Expression von Genen der Pathogenabwehr in allen Pflanzenteilen zu einem verminderten Wachstum führte, während dieser Effekt bei einer induzierten oder gewebespezifischen Expression nicht beobachtet wurde.

4.1.2.3 Der Promotor von BvTlp2 eignet sich in Tabak für die Expression von Pathogenabwehrgenen oder von Genen, die die Nährstoffaufnahme aus dem Boden verbessern

Der Promotor von BvTlp2 wies in der Zuckerrübe kein einheitliches Expressionsprofil auf und scheint deshalb nicht für die gewebespezifische Expression von Genen in transgenen Zuckerrüben geeignet zu sein (Abb. 12). Da jedoch der Promotor in Tabak ein sehr gewebespezifisches Expressionsprofil aufweist, könnte er in Tabak oder evtl. auch in anderen Pflanzen für eine gewebespezifische Expression eingesetzt werden. Der BvTlp2 Promotor vermittelt eine sehr starke Expression in den Wurzelhaaren bzw. in der Wurzelepidermis (Abb. 21b). Die Wurzelhaare und die Wurzelepidermis stehen in direkten Kontakt zum Boden und spielen bei der Aufnahme von Nährstoffen eine große Rolle (Bucher, 2002). Der BvTlp2 Promotor könnte aufgrund seiner Spezifität beispielsweise dazu eingesetzt werden, um die Nährstoffaufnahme aus dem Boden zu verbessern. Zimmermann *et al.* (2003) setzen einen wurzelhaarspezifischen Promotor aus der Tomate ein, um transgene Pflanzen herzustellen, die das Enzym Phytase über die Wurzelhaare in die umgebene Erde abgeben. Dies führte zu einer verbesserten Phosphataufnahme durch die Pflanze, da die Sekretion der Phytase es ermöglichte, sonst nicht zugängliche Phosphorverbindungen aus der Umgebung zu mobilisieren.

Weiterhin könnte der BvTlp2 Promotor wie der BvTlp1 Promotor mit Genen der Pathogenabwehr fusioniert werden. Im Gegensatz zu mit dem BvTlp1 Promotor fusionierten Pathogenabwehrgenen, die gewebespezifisch im Xylemparenchym exprimiert werden würden, wäre der Einsatz des BvTlp2 Promotors für die Expression von Abwehrgenen gegen Pathogene gerichtet, die die Pflanze über die Wurzelhaare oder die Wurzelepidermis befallen. Damit könnte ein sehr breites Spektrum an schädlichen Organismen (Viren, Bakterien, Pilze, Fraßfeinde) abgewehrt werden. Die gewebespezifische Expression der Pathogenabwehrgene könnte die gleichen Vorteile gegenüber der konstitutiven Expression haben wie sie in Kap. 4.1.1.1 bzw. Kap. 4.1.2.2 beschrieben worden sind (Heil und Baldwin, 2002).

Bevor der BvTlp2 Promotor in Tabak oder anderen Pflanzen für die spezifische Expression von Transgenen eingesetzt werden kann, muss noch untersucht werden, ob das Expressionsprofil von auf Erde kultivierten Pflanzen dem der unter sterilen Bedingungen

kultivierten Pflanzen entspricht. Sollte der Promotor durch die Kultivierung auf Erde bzw. unter Freilandbedingungen in anderen Geweben durch äußere Faktoren induzierbar sein, könnte der Promotor trotzdem noch für die beschriebenen Zwecke eingesetzt werden. Dazu müssten jedoch zunächst die Promotorelemente, die die Induktion des Promotors bewirken, identifiziert und aus dem Promotorbereich entfernt werden. Grundlage für diese Vorgehensweise ist, dass Promotoren modular aufgebaut sind (Potenza *et al.*, 2004).

4.2 Funktionsanalyse der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana*

4.2.1 Unterschiede in den Expressionsprofilen der einzelnen Linker-Histon-Varianten deuten darauf hin, dass die Varianten spezifische Funktionen haben

Pflanzliche Linker-Histone werden anhand ihrer Größe in zwei Klassen unterteilt (Scippa *et al.*, 2004). In *Arabidopsis thaliana* gibt es insgesamt drei Linker-Histon-Varianten. His1-1 und His1-2 gehören zur Gruppe der „größeren“ Varianten, His1-3 wird zu den „kleineren“ (minor) Varianten gezählt. Für die Expressionsanalyse dieser drei Linker-Histon-Varianten wurden Promotor-GUS-Konstrukte stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Anschließend wurden qualitative und quantitative GUS-Assays zur Bestimmung der Expressionsprofile durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die erste, umfassende Expressionsanalyse, die für alle Linker-Histon-Varianten einer Pflanze durchgeführt worden ist. Bisher wurden in Pflanzen lediglich die kleinen („minor“) Linker-Histon-Varianten von Pflanzen hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens untersucht, nicht jedoch die großen (Wei und O’Connell, 1996 Scippa *et al.*, 2004, Ascenzi und Gantt, 1999, Przewloka *et al.*, 2002).

Die Promotoren von His1-1 und His1-2 vermitteln in allen untersuchten Geweben eine starke Expression des Reportergens (Abb. 24 und Abb. 26). Die Reportergenaktivität der His1-1 Promotor-GUS-Linien ist mit Ausnahme des Wurzelgewebes sogar höher als in der untersuchten CaMV 35S GUS-Vergleichslinie (Abb. 26). His1-3 ist am stärksten im Blattgewebe aktiv, in anderen Geweben wird eine schwächere Expression des Reportergens beobachtet, die aber mit Ausnahme der Wurzel junger Keimlinge histochemisch noch nachweisbar ist (Abb. 24 bis 26). Signifikant ist die Beobachtung, dass die jeweiligen Varianten ein spezifisches Expressionsprofil aufweisen, d. h. sie werden in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert (Abb. 26). Eine ähnliche Beobachtung ist auch für die somatischen Linker-Histon-Varianten His1a, 1b, 1c, 1d und 1e (siehe Einleitung) der Maus gemacht worden. Diese Varianten werden ebenfalls ubiquitär, jedoch unterschiedlich stark, in verschiedenen Geweben exprimiert (Lennox und Cohen, 1983; Wang *et al.*, 1997, Alami *et al.*, 2003).

Die Unterschiede in der Expression in den einzelnen Geweben könnten ein Indiz dafür sein, dass die einzelnen Linker-Histon-Varianten jeweils in den einzelnen Geweben spezifische Funktionen haben. Dies wird auch für die unterschiedlich exprimierten Linker-Histon-Varianten in Mammalia vermutet. Jedoch konnte bislang lediglich nur in wenigen Fällen gezeigt werden, dass einzelne Linker-Histon-Varianten in Mammalia tatsächlich eine spezifische Funktion haben. Für eine somatische Linker-Histon-Variante aus der Maus wurde gezeigt, dass sie für die Expression des Master-Regulators MyoD notwendig ist (Lee *et al.*, 2004, siehe Einleitung). Weiterhin spielt ein H1 Subtyp aus der Ratte eine Rolle bei der durch DNA-Schäden hervorgerufenen Apoptose (Konishi *et al.*, 2003). Hier hat sie eine

Funktion bei der Signalübertragung vom Zellkern zu den Mitochondrien, die über mehrere Schritte zur Apoptose führt. Für pflanzliche Linker-Histone wurden bisher noch keine spezifischen Funktionen nachgewiesen. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse deuten aber darauf hin, dass einzelne Varianten eine gewebespezifische Funktion haben könnten.

4.2.2 Vorteile der Funktionsanalyse von Linker-Histon-Varianten durch PTGS

Die RNAi/PTGS-Technologie ist eine Technologie, die seit der Entdeckung der RNA Interferenz für die Analyse von Genfunktionen an enormer Bedeutung gewonnen hat. In der Regel ist diese Technologie sehr effizient und kann effektiv zum Knock-down von Genen eingesetzt werden (Chuang und Meyerowitz, 2000, Varsha-Wesley *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde PTGS mit der Zielstellung eingesetzt, eine ganze Genfamilie, die Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana*, zu silencen. Dazu wurden zunächst ihp-Konstrukte, die für doppelsträngige RNA kodieren, in *Arabidopsis thaliana* transformiert, um spezifisch die einzelnen Linker-Histone zu silencen und somit Single-Knock-downs zu generieren. Die drei Single-Knock-downs für die einzelnen Linker-Histon-Varianten wurden anschließend zur Herstellung von Triple-Knock-downs miteinander gekreuzt. Die Selektion der Kreuzungsprodukte wurde dadurch erleichtert, dass die einzelnen Single-Knock-down Linien unterschiedliche pflanzliche Selektionsmarker trugen. Hintergrund für die Wahl dieses Ansatzes, Silencing von allen Linker-Histon-Varianten, war, dass vorherige Studien gezeigt hatten, dass die Eliminierung von einzelnen Linker-Histon-Varianten die Fragestellung, ob Linker-Histone für höhere Eukaryoten essentiell sind, nicht beantworten konnte. Die Eliminierung einzelner Linker-Histon-Varianten wurde in der Regel durch die verstärkte Expression der übrigen Varianten kompensiert (Ausio, 2000). Um diesen beispielsweise auch in Tabak (Prymakowska-Bosak *et al.*, 1999) beobachteten Kompensationseffekt auszuschließen, sollten alle Linker-Histon-Varianten gesilenced werden.

Durch einen PTGS-Ansatz wird zwar ein Knock-out einer Genfunktion nicht vollständig erreicht, wie es beispielsweise in einer T-DNA-Insertionslinie der Fall ist (Alonso *et al.*, 2003), jedoch sind die Effekte ähnlich, da die Genfunktion in der Regel weitestgehend ausgeschaltet wird (Varsha-Wesley *et al.*, 2001). Deshalb spricht man analog zu dem Begriff „Knock-out“ beim Einsatz von doppelsträngiger RNA von einem „Knock-down“.

Der PTGS-Ansatz hat gegenüber einem Knock-out Ansatz den Vorteil, dass die Anwesenheit eines dsRNA-Konstruktes ein Gen dominant silenced. Da das Silencing kein rezessiver, sondern ein dominanter Effekt ist, bedeutet dies, dass in einem relativ kurzen Zeitraum durch Kreuzung unterschiedlicher Knock-downs mehrere Gene in einer Pflanze eliminiert werden können. Dies ist besonders dann möglich, wenn, wie beschrieben, die einzelnen T-DNA-Konstrukte unterschiedliche pflanzliche Selektionsmarker enthalten. Dadurch ist ein PTGS-Ansatz prinzipiell sehr gut geeignet, ganze Genfamilien zu silencen. Dies ist besonders dann

von Interesse, wenn, wie im Falle der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana*, das Silencing einzelner Mitglieder einer Genfamilie keinen Effekt bewirkt.

Im Gegensatz zu einem PTGS-Ansatz liegt ein Knock-out einer Genfunktion, beispielsweise durch eine T-DNA-Insertion, nur dann vor, wenn die Pflanze für die jeweilige T-DNA-Insertion homozygot ist. Dies führt zu einem erhöhten zeitlichen Aufwand, wenn mehrere Knock-outs miteinander gekreuzt werden sollen. Weiterhin liegen zur Zeit noch nicht für alle Gene von *Arabidopsis thaliana* Knock-out-Linien vor. Deshalb sind teilweise noch nicht die Voraussetzungen gegeben, einzelne Gene bzw. Genfamilien über einen Knock-out Ansatz zu eliminieren. Aus diesem Grund wäre auch ein Knock-out-Ansatz für die Linker-Histone von *Arabidopsis thaliana* nicht möglich gewesen. Für His1-2 gibt es noch keine T-DNA-Insertionslinie und für His1-3 liegt lediglich eine Linie mit einer T-DNA-Insertion im Promotorbereich vor. Diese Linie könnte somit eventuell noch funktionelles His1-3 exprimieren.

4.2.3 Problematik der Funktionsanalyse von Linker-Histon-Varianten durch PTGS

Es ist im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, über den beschriebenen Ansatz die drei Linker-Histone durch die Herstellung von Triple-knock-downs zu silencen. Jedoch können die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag für die zukünftige Durchführung von Experimenten hinsichtlich auf den Einsatz der PTGS/RNAi-Technologie leisten.

Die Arbeiten zeigen, dass es wichtig ist, den Effekt von RNAi-Konstrukten auf Proteinebene zu untersuchen. Dies ist besonders dann von Bedeutung, wenn die untersuchten Organismen keinen abweichenden Phänotypen aufweisen. Das Vorliegen keines abweichenden Phänotyps kann bedeuten, dass das jeweils untersuchte Gen keine entscheidende Funktion übernimmt. Es kann aber auch bedeuten, dass die untersuchte Genfunktion nicht ausreichend ausgeschaltet ist. Um zu verhindern, dass deshalb keine falschen Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens gezogen werden, sind in diesem Fall Analysen des Silencing-Effektes auf Proteinebene notwendig.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Kreuzungen zwischen den drei Linker-Histon Single-Knock-downs zeigten im Vergleich zum Wildtyp keinen abweichenden Phänotyp (Abb. 30). Eine Analyse auf mRNA-Ebene durch semiquantitative RT-PCRs hatte zwar gezeigt, dass die transformierten ihp-Konstrukte im Triple-Knock-down die Transkriptmenge ihrer Zielgene reduzieren (Abb. 29), jedoch war auf Proteinebene zumindest für His1-1 kein Silencing-Effekt nachweisbar (Abb. 32). Dies bedeutet, dass in den untersuchten Triple-Knock-down Linien für His1-1 die Reduktion des Transkriptgehaltes vermutlich nicht ausreichend ist, um die Proteinmenge zu reduzieren. Eine ähnliche Beobachtung wurde für einige His1-1 Single-Knock-down-Linien gemacht (Abb. 33, siehe unten). Die Stärke der

Reduktion des Transkriptgehaltes durch die *ihp*-Konstrukte war mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar, in denen auch semiquantitative RT-PCRs zur Analyse von Silencing-Effekten auf mRNA-Ebene eingesetzt wurden (z.B. Sen *et al.*, 2004).

Die Arbeiten zeigen, dass es essentiell ist, die Effekte von doppelsträngiger RNA auf Proteinebene zu untersuchen, wenn in einem PTGS-Ansatz kein abweichender Phänotyp beobachtet wird. Es kann sogar dann essentiell sein, wenn auf RNA-Ebene ein Silencing-Effekt nachgewiesen wurde. Ausschlaggebend für den Verlust oder das Vorhandensein einer Genfunktion ist die Menge an vorhandenem Protein für dieses Gen. Auch signifikant reduzierte Mengen an Transkript können, wie gezeigt, zum Erhalt einer Genfunktion ausreichen.

4.2.4 Ist das Silencing von His1-1 kopienabhängig?

Im Gegensatz zu den Triple-Knock-down Linien (Abb. 32) weisen vier der sechs untersuchten Single-Knock-down Linien einen signifikant niedrigeren Proteingehalt von His1-1 als im Wildtyp auf (Abb. 33). Semiquantitative RT-PCR-Analysen wurden zur Quantifizierung des His1-1 Transkriptgehaltes mit den gleichen Linien durchgeführt. Die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse (Abb. 34) korrelieren jedoch nur teilweise mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse, da nicht nur in den vier Linien mit dem reduzierten Proteingehalt, sondern in allen sechs Linien auf mRNA-Ebene ein im Vergleich zum Wildtyp verringerter His1-1 Transkriptgehalt nachgewiesen wurde. Weiterhin ist der Grad der Reduktion des mRNA-Gehaltes von His1-1 in den Linien mit bzw. ohne Silencing-Effekt auf Proteinebene miteinander vergleichbar. Das heißt, dass es nicht möglich ist, von dem Grad der Reduktion der His1-1 mRNA darauf zu schließen, ob auch ein Silencing auf Proteinebene vorliegt.

Northern-Blot-Analysen, die zum spezifischen Nachweis von His1-1 siRNAs durchgeführt wurden, weisen in fünf der untersuchten sechs Single-Knock-down-Linien die Anwesenheit von His1-1 spezifischen siRNAs nach (Abb. 35). Dies deutet darauf hin, dass zumindest in fünf der untersuchten sechs Linien die Reduzierung des His1-1 Transkriptgehaltes durch PTGS hervorgerufen wird. Demnach ist das transformierte *ihp*-Konstrukt gegen His1-1 im Prinzip funktionell. Bei der Linie, in der keine His1-1 spezifischen siRNAs nachgewiesen wurden, handelt es sich um eine der beiden Linien, die auf Proteinebene keinen Silencing-Effekt zeigt. Im Gegensatz dazu weist die zweite Linie ohne Silencing Effekt His1-1 spezifische siRNAs auf (vergl. Abb. 35 mit Abb. 33). Somit korrelieren die Ergebnisse aus der Northern-Blot-Analyse (Abb. 35), wie schon die Ergebnisse aus der semiquantitativen RT-PCR, nicht vollständig mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse (Abb. 33).

Interessanterweise verfügen drei der vier Linien mit einem signifikant reduzierten Proteingehalt (Abb. 33) über zwei T-DNA-Loci für das *ihp*-Konstrukt. Die vierte Linie mit reduziertem His1-1 Gehalt weist einen T-DNA-Locus auf, ebenso wie die beiden Linien, deren Proteingehalt im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist. Zusammengefasst könnte dies darauf hindeuten, dass der Silencing-Effekt bezogen auf das Silencing von His1-1 in Zusammenhang mit der Kopienzahl steht. Das heißt, dass eine höhere Kopienzahl einen besseren Silencing-Effekt bewirken könnte. Um dazu jedoch eine eindeutigere Aussage machen zu können, hätten zum einen mehr His1-1 Single-Knock-down Linien als die untersuchten sechs für die Analysen zur Verfügung stehen müssen. Zum anderen hätte eine Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der genauen Kopienzahl in den einzelnen Linien durchgeführt werden müssen, da die Kopienzahl und die Anzahl der Loci nicht gleichgesetzt werden können.

In der Regel reichen schon geringe Mengen an doppelsträngiger RNA aus, um spezifisch mRNA zu degradieren und Knock-down-Effekte zu erzielen (Denli und Hannon, 2003). Jedoch zeigen einige Studien, dass der RNAi-Effekt auch von der Konzentration an doppelsträngiger RNA abhängig ist (Desset *et al.*, 2003). Bei diesen Studien handelt es sich allerdings größtenteils um Experimente, in denen Zellen oder Organismen doppelsträngige RNA in Form von künstlich synthetisierten siRNAs zugeführt worden ist. Jedoch zeigten Lee *et al.* (2004), übereinstimmend mit den Ergebnissen für das Silencing von His1-1, dass für den stabilen Knock-down eines Gens, das in *Drosophila* für die Pigmentierung der Augen verantwortlich ist, zwei Kopien des RNAi-Konstruktes notwendig waren. Eine Kopie des RNAi-Konstruktes war für den Knock-down nicht ausreichend.

Zwar ist die RNAi/PTGS-Technologie in der Regel sehr effizient, jedoch können einige Faktoren einen Einfluss auf die Effektivität der RNA Interferenz bzw. des PTGS haben. Zum einen kann die Effektivität der RNA Interferenz bzw. des PTGS davon abhängig sein, wie stark die Gene exprimiert werden, die gesilenced werden sollen, bzw. wie stabil die Genprodukte sind (Tuschl und Borkhardt, 2002, Harborth *et al.*, 2001). Wie die quantitative Expressionsanalyse für den Promotor von His1-1 zeigt, handelt es sich bei dem His1-1 Promotor um einen Promotor, der sehr stark aktiv ist und sogar in fast allen untersuchten Geweben eine höhere Expression des Reportergens als der CaMV 35S Promotor vermittelt (Abb. 26). Die hohe Aktivität des His1-1 Promotor und die damit vermutlich verbundene hohe Konzentration an His-1-1 mRNA könnten der Grund dafür sein, dass His1-1 nicht in allen Linien effektiv gesilenced wird.

Zum anderen ist die Effektivität der RNA Interferenz davon abhängig, wie homolog die Sequenzen der eingeführten doppelsträngigen RNA zu den jeweiligen Zielgenen sind, die gesilenced werden sollen. Die Sequenzen der dsRNA bzw. der mRNA müssen für ein

effektives Silencing weitestgehend übereinstimmen (Desset *et al.*, 2003). Im Falle der für das Silencing der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* eingesetzten Konstrukte stimmen die eingesetzten Sense- bzw. Antisensebereiche vollständig mit den Zielsequenzen überein. Die Bereiche, die für die doppelsträngige RNA kodieren, sind mittels PCR aus der gleichen Wildtyp-Linie (Col-0) amplifiziert worden, die auch später für die Transformation der ihp-Konstrukte eingesetzt worden ist (Kap. 2.8.3). Durch eine Sequenzierung war die Sequenz der amplifizierten Bereiche verifiziert worden. Die Sequenz entsprach der annotierten Sequenz, so dass eine mangelnde Übereinstimmung zwischen der Sequenz der dsRNA und der zu degradierenden mRNA als Ursache für die teilweise geringe Effektivität des Silencings ausgeschlossen werden kann.

Das Silencing von His1-1 durch ein His1-1 spezifisches ihp-Konstrukt ist nur teilweise effektiv. Signifikante Reduzierungen des Proteingehaltes wurden besonders in Linien mit zwei T-DNA-Loci beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass das Silencing von His1-1 kopienabhängig ist. Jedoch wurde auch in einer Linie mit nur einem T-DNA-Locus ein reduzierter Proteingehalt nachgewiesen.

4.2.5 Wird der Silencing-Effekt für His1-1 nicht vererbt?

Ein weiteres überraschendes Resultat aus der Analyse mit den His1-1-Single-Knock-down Linien ist die Beobachtung, dass für die Linie A16 im Single-Knock-down auf Proteinebene ein Silencing nachgewiesen werden kann (Abb. 33), dass aber im Gegensatz dazu, in der Triple-Knock-Linie 1, für deren Herstellung u. a. die Linie A16 eingesetzt worden ist, kein Silencing auf Proteinebene vorliegt (Abb. 32). Durch PCR-Analysen wurde gezeigt, dass das ihp-Konstrukt für His1-1 in Triple-Knock-down Pflanzen noch vorliegt (nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass der Silencing-Effekt des His1-1 Konstruktes nicht vererbt wird. Jedoch könnte der Verlust des Silencing-Effektes auch dadurch hervorgerufen worden sein, dass die Expression des ihp-Konstruktes transkriptionell durch Methylierung im CaMV 35S Promotorbereich, der die Expression des ihp-Konstruktes reguliert, herunterreguliert wird. Die Methylierung im CaMV 35S Promotorbereich ist ein recht häufig auftretendes Phänomen. Sie wird besonders dann beobachtet, wenn wie in den Linker-Histon Triple-Knock-down Pflanzen mehrere CaMV 35S Promotorbereiche im Genom einer Pflanze vorliegen (Lessard *et al.*, 2002). Es wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht, ob die ihp-Konstrukte im Triple-Knock-down transkriptionell gesilenced sind. Deshalb kann die Ursache für das divergente Verhalten der Linie A16 noch nicht eindeutig benannt werden.

5. Zusammenfassung

Für die Expression von Transgenen in Pflanzen werden Promotoren benötigt, die die Expression dieser Gene regulieren. Durch den Einsatz von Promotoren, die eine gewebespezifische Expression vermitteln, können unerwünschte Effekte, die eine konstitutive Expression von Transgenen in Pflanzen haben könnte, vermieden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Reporteranalysen das Expressionsprofil von fünf putativ wurzelspezifischen Promotoren aus der Zuckerrübe in Tabak und in der Zuckerrübe analysiert. Diese Promotoren regulieren in der Zuckerrübe die Expression eines Major-Latex-Like Proteins (BvMII), zweier Thaumatin-Like Proteine (BvTlp1 und BvTlp2), die Expression einer Linker-Histon-Variante (BvHis1-r) sowie die Expression eines kleinen Proteins mit unbekannter Funktion (BvSmp).

Drei der untersuchten Promotoren, die Promotoren von BvTlp2, BvHis1-r und BvSmp, vermitteln neben einer Expression in der Wurzel eine, wenn auch meist schwächere, Reporteraktivität im Blatt. Zwei der Promotoren, die Promotoren von BvTlp1 und BvMII, werden spezifisch in der Wurzel der Zuckerrübe exprimiert, nicht aber im Blatt. Innerhalb der Wurzel weisen diese beiden Promotoren unterschiedliche Expressionsprofile auf. Während der BvMII Promotor in den parenchymatischen und den vaskulären Bereichen der gesamten Rübe aktiv ist, zeigt der BvTlp1 Promotor eine sehr hohe Spezifität für das Xylemparenchym. Aufgrund der verschiedenen Expressionsprofile können die beiden Promotoren für zahlreiche unterschiedliche, biotechnologische Anwendungen in transgenen Zuckerrüben geeignet sein.

Da es sich bei dem Genprodukt von BvTlp1 um ein Protein der Pathogenabwehr handelt, deutet die von seinem Promotor vermittelte Expression im Xylemparenchym darauf hin, dass es vermutlich in der Abwehr von Pathogenen eine Rolle spielt, die sich wie *Fusarium oxysporum* f. sp. *Betae* in der Zuckerrübe über das Xylem ausbreiten.

Obwohl Tabak und Zuckerrübe nur entfernt miteinander verwandt sind, gibt es in den beiden Pflanzenarten hinsichtlich der beobachteten Expressionsprofile der fünf untersuchten Promotoren neben einigen Unterschieden mehrere Gemeinsamkeiten. Dies deutet darauf hin, dass mehrere der für die Regulation verantwortlichen *cis*- und *trans*- Faktoren für diese Promotoren in beiden Systemen funktionell und somit relativ konserviert sind. Sehr auffällig ist, dass drei der untersuchten Promotoren in Tabak spezifisch im Hypokotyl und der Wurzel exprimiert werden, jedoch kaum im Blatt. Diese Beobachtung ist insofern signifikant, da die Rübe der Zuckerrübe aus der Primärwurzel und dem Hypokotyl des Keimlings hervorgeht.

Einer der untersuchten Promotoren, der Promotor von BvHis1-r, reguliert in der Zuckerrübe die Expression einer Linker-Histon-Variante, die in der Rübe stärker als im Blatt exprimiert

wird. Höhere Eukaryoten verfügen über mehrere Linker-Histon-Varianten. Die genaue Funktion der einzelnen Linker-Histon-Varianten ist noch nicht geklärt. Weiterhin ist noch nicht bekannt, ob Linker-Histone für Pflanzen essentiell sind. Um einen Beitrag zur Beantwortung dieser offenen Fragestellungen zu leisten, wurden Konstrukte, die für doppelsträngige RNA kodieren, in *Arabidopsis thaliana* transformiert, um die einzelnen Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* (His1-1, His1-2 und His1-3) durch posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS) spezifisch zu silencen. Durch nachfolgende Kreuzungen der einzelnen Single-Knock-downs sollten alle Linker-Histon-Varianten gesilenced werden.

Alle hergestellten Linien weisen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf. Durch semiquantitative RT-PCR-Analysen wurde nachgewiesen, dass der mRNA-Gehalt der einzelnen Linker-Histon-Varianten in den entsprechenden Linien im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert ist. Jedoch zeigten Western-Blot-Analysen, dass die beobachtete Reduktion des Transkriptgehaltes zumindest für His1-1 in den drei Triple-Knock-down Linien nicht ausreicht, um auch den Proteingehalt im Vergleich zum Wildtyp zu reduzieren.

Im Gegensatz zu den Triple-Knock-down Linien wurde für His1-1 Single-Knock-down Linien in einigen Linien ein signifikant geringerer Proteingehalt als im Wildtyp nachgewiesen. Da hauptsächlich Linien mit zwei Loci für das His1-1 dsRNA-Konstrukt einen reduzierten Proteingehalt aufweisen, könnte der Silencing-Effekt des His1-1 Konstruktes abhängig von der Anzahl der Loci sein.

Zur Komplementation der Funktionsanalyse wurde eine Expressionsanalyse der Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Dazu wurde untersucht, ob Linker-Histone gewebespezifisch exprimiert werden. Für diese Analysen wurden Promotor-Reportergenkonstrukte für die einzelnen Varianten stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen, dass die Promotoren weitestgehend in allen untersuchten Geweben aktiv sind. Die Promotoren sind jedoch in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark aktiv und weisen somit jeweils ein spezifisches Expressionsprofil auf. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Linker-Histon-Varianten von *Arabidopsis thaliana* jeweils eine gewebespezifische Funktion haben.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen, dass es für die Funktionsanalyse von Genen durch RNAi essentiell ist, einen Effekt von doppelsträngiger RNA nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene zu untersuchen. Dies ist besonders relevant bei der Funktionsanalyse von Genfamilien, wenn mehrere oder alle Proteine einer Genfamilie gesilenced werden sollen und kein abweichender Phänotyp beobachtet wird.

6. Literatur

Affolter, M., Cote, J., Renaud, J., Ruiz-Carrillo, A. (1987). Regulation of histone and beta A-globin gene expression during differentiation of chicken erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3663-3672.

Alami, R., Fan, Y., Pack, S., Sonbuchner, T., Besse, A., Lin, Q., Greal, J.M., Skoultchi, A.I., Bouhassira, E.E. (2003). Mammalian linker-histone subtypes differentially affect gene expression *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 5920-5925.

Alonso, J.M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C. C., Ecker, J. R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.

An, Y.-Q., Huang, S., McDowell, J. M., McKinney, E. C., Meagher, R. B. (1996). Conserved expression of the *Arabidopsis* ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *Plant Cell* 8, 15-30.

Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.

Artschwager, E. (1926). Anatomy of the vegetative organs of the sugar beet. *J. Agric. Res.* 33, 143-176.

Ascenzi, R., Gantt, J.S. (1997). A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Mol. Biol.* 34, 629-641.

Ascenzi, R., Gantt, J.S. (1999). Molecular Genetic Analysis of the Drought-Inducible Linker Histone Variant in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 41, 159-169.

Ausio, J. (2000). Are linker histones (histone H1) dispensable for survival? *Bioessays* 22, 873-877.

Austin, S., Bingham, E.T., Koegel, R.G., Mathews, D.E., Shahan, M.N., Straub, R.J., Burgess, R.R. (1994). An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in alfalfa. In: Recombinant DNA Technology II, Bajpal, R., Prokop, A. (Herausgeber), Ann. N. Y. Acad. Sci. 721, 234-244.

Baulcombe, D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant. Biol. 2, 109-113.

Bartsch, H.J. (1994): Taschenbuch mathematischer Formeln, 16. Auflage, Fachbuchverlag, Leipzig, Köln, Seite 565

Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol. Biol. 20, 1195-1197.

Bellen, H.J. (1999). Ten Years of Enhancer Detection: Lessons from the Fly. Plant. Cell. 11, 2271-2282.

Benfey, P.N., Chua, N.H. (1990a). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. Science, 250, 959-966.

Benfey, P.N., Ren, L. & Chua, N.H. (1990b). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. EMBO J., 9, 1677- 1684.

Berger, F., Gaudin, V. (2003). Chromatin dynamics and *Arabidopsis* development. Chromosome Res., 11, 277-304.

Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R. (2002). Constitutive expression of ethylene-response-factor 1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. Plant J. 29, 23-32.

Bevan, M.W., Flavell, R.B., Chilton, M.D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304, 184-187.

Bosemark, N.O. (1993). Genetics and breeding. The Sugar Beet Crop (Cooke, D.A., Scott, R.K., Herausgeber) 66-119.

Börnke, F., Hajirezaei, M., Sonnewald, U. (2001): Cloning and Characterization of the Gene Cluster for Palatinose Metabolism from the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia rhapontici*. J. Bacteriol. 183, 2425-2430.

Börnke, F., Hajirezaei, M., Sonnewald, U. (2002a). Potato tubers as bioreactors for palatinose production. J. Biotechnol. 96, 119-124.

Börnke, F., Hajirezaei, M., Heineke, D., Melzer, M., Herbers, K, Sonnewald, U. (2002b). High-level production of the non-cariogenic sucrose isomer palatinose in transgenic tobacco plants strongly impairs development. Planta, 214, 356-64.

Bowling, S. A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A. S., Klessig, D. F., Dong, X. (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. Plant Cell 6, 1845-1857.

Bowling, S. A., Clarke, J. D., Liu, Y., Klessig, D. F., Dong, X. (1997). The cpr5 mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. Plant Cell 9, 1573-1584.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Bucher, M. (2002). Molecular root bioengineering. In: Plant Roots: The Hidden Half.(Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U., Herausgeber) Marcel Dekker Inc., New York, 279-294.

Catez, F., Yang, H., Tracey, K., Reeves, R. Misteli, T., Bustin, M. (2004). A network of dynamic interactions between histone H1 and HMG proteins in chromatin. Mol. Cell. Biol. 24, 4321-4328.

Chen, W, Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., Zhu, T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell 14, 559-574.

Chilton, W.S., Chilton, M.D. (1984). Mannityl opine analogs allow isolation of catabolic pathway regulatory mutants. *J. Bacteriol.* 158, 650-658.

Chuang, C.F., Meyerowitz, E.M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4985-4990.

Cirillo, L.A., Zaret, K.S. (2004). A linker histone restricts muscle development. *Science* 304, 1607-1609.

Clough, S.J., Bent A.F.(1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-43.

Crane-Robinson, C. (1997). Where is the globular domain of linker histone located on the nucleosome? *Trends Biochem. Sci.* 22, 75–77.

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 13, 4777-4788.

De Jaeger, G., Scheffer, S., Jacobs, A., Zambre, M., Zobell, O., Goossens, A., Depicker, A., Angenon, G. (2002). Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat. Biotechnol.* 20, 1265-1268.

Delange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L., Bonner, J. (1969). Calf and pea histone IV. 3. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV: comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.* 244, 5669-5679.

Denli, A.M., Hannon G.J. (2003). RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends. Biochem. Sci.* 28, 196-201.

Desset, S., Meignin, C., Dastugue, B., Vaury, C. (2003). COM, a Heterochromatic Locus Governing the Control of Independent Endogenous Retroviruses From *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 164, 501-509.

De Wilde, C., Peeters, K., Jacobs, A., Peck, I., Depicker, A. (2002). Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants. *Mol. Breeding* 9, 271-282.

Diatchenko, L., Lau, Y.F.C., Campell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025-6030.

Elliot, M.C., Weston, G.D. (1993). Biology and Physiology of the Sugar-beet Plant. In: The Sugar Beet Crop (Cooke, D.A, Scott, R.K., eds.) Chapman and Hall, London.

Elmayan, T., Tepfer, M. (1995). Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rol D promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S² promoter. *Transgenic Res.* 4, 388-396.

Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E. M., Zhao, J., Magnuson, T. R., Woodcock, C. L., Skoultchi, A. I. (2003). H1 Linker Histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4559-4572.

Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R. G., Ayala, J., Skoultchi, A. I. (2001). Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H10 replacement subtype. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7933-7943.

Felsenfeld (1996): Chromatin unfolds. *Cell* 86, 13-19.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.

Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Twyman, R.M. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 152–158.

Franke, W. (1997). Nutzpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York.

Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4803-4807.

Giaquinta, R. T. (1983). Phloem-loading of sucrose. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34, 347-387.

Granger, C. (2000). A Sweeter Deal Than Expected From Transgenic Sugar Beets. In: ISB-News-Report, Februarausgabe, 4-6.

Greiner, S., Rausch, T., Sonnewald, U., Herbers, K. (1999). Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nature Biotechnol.* 17, 708–711.

Hames, B.D. and Rickwood, D. (1996) *Gel electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.

Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J. (2001). Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA. *Nature Rev. Gen.* 2, 110-119.

Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T., Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114, 4557–4565.

Hardison, R., Chalkley, R. (1978). Polyacrylamide gel electrophoretic fractionation of histones. In: *Methods in Cell Biology* 17 (Herausgeber: Stein, G., Stein, J., Kleinsmith, L.J). Academic Press, New York.

Harveson R.M., Rush., C.M. (1997). Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugar beet as determined by vegetative compatibility. *Plant Disease* 81, 85-88.

Harvey, A. C., Downs, J. A. (2004). What functions do linker histones provide? *Mol. Microbiol.*, 53, 771–775.

Hayward, H.E.(1938). *The structure of economic plants*. MacMillan, New York.

Hehl, R. and Baker, B. (1989). Induced transposition of Ds by a stable Ac in crosses of transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* 217, 53-59.

Hehl, R., Oltmanns, H., Stahl, D. (2004). Wurzel- und xylemparenchymspezifischer Promotor. Deutsches Patenamt München. Aktenzeichen 10 2004 043 207.4, eingereicht.

Heil, M., Baldwin, I.T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept, *Trends Plant Sci.* 7, 61–67.

Hellauer, K., Sirard, E., Turcotte, B. (2001). Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1. *J. Biol. Chem.* 276, 13587-92.

Helliwell, C., Waterhouse, P. (2003). Constructs and methods of high throughput gene silencing in plants. *Methods*, 30, 289-295.

Hendzel, M. J., Lever, M. A., Crawford, E., Th'ng, J. P. H. (2004). The C-terminal domain is the primary determinant of Histone H1 binding to Chromatin *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 279, 20028-20034.

Hejgaard, J., Jacobsen, S., Svendsen, I. (1991). Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Lett.* 291, 127-131.

Herrera-Estrella, L., Depicker, A., van Montagu, M., and Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.

Hoffmann, G., M., Schmutterer, H. (1999). Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

van Holde, K. E. (1989). Chromatin. Springer-Verlag, New York.

Honma, M.A., Baker, B.J., Waddell, C.S. (1993). High-frequency transposition of Ds-ALS in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6242-6246.

Horn, M.E., Woodard, S.L., Howard, J.A. (2004). Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep.* 22 (10), 711-20.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rofers, S.G., Fraley, R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

Hutvagner, G., Zamore, P.D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 225-232.

Iizuka, M, Smith, M.M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 154-160.

Ito, H., Hiraga, S., Tsugawa, H. , Matsui-H, Honma, M., Otsuki,Y., Murakami, T., Ohashi, Y., Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants, *Plant Sci.* 155, 85-100.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987a). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

Jefferson, R.A. (1987b). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405.

Kasinsky, H.E., Lewis, J.D., Dacks, J., Ausio, J. (2001). Origin of H1 linker histones. *FASEB J.* 15, 34-42.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17, 287-291.

Kawalleck, P., Somssich, I.E., Hahlbrock, K., Feldbrügge, M., Weisshaar, B. (1993). Polyubiquitin gene expression and structural properties of the *ubi4-2* gene in *Petroselinum crispum*. *Plant Mol. Biol.* 21, 673-684.

Kitajima, S., Fumihiko, S. (1999) Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. *J. Biochem.* 125, 1-8.

Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327, 70-73.

Kloos, D. U., Oltmanns, H., Dock, C., Stahl, D., Hehl, R. (2002). Isolation and molecular analysis of six taproot expressed genes from sugar beet. *J. Exp. Bot.* 53, 1533-1534.

Klotz, K.L., Campbell, L.G. (2003) Comparison of sucrose catabolism in roots of three *Beta Vulgaris* L. genotypes with different yield and sucrose accumulating capacities. Proceedings of the 1st Joint International Institute For Beet Research and The American Society Of Sugar Beet Technologists Congress. 505-509.

Köhler, U., Liaud, M.-F., Mendel, R. R., Cerff, R., Hehl, R. (1995). The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. Plant Mol. Biol. 29, 1293-1298.

Koiwa, H., Kato, H., Nakatsu, T., Junichi, O., Yamada, Y., Sato, F.(1997): Purification and characterisation of tobacco Pathogenesis-Related Protein 5d, an antifungal Thaumatin-like Protein. Plant Cell Physiol. 38, 783-791.

Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A.I., Tsujimoto, Y. (2003). Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. Cell 114, 673–688.

Laemmli, K.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lange, W., Brandenburg, W.A., De Bock, T.S.M. (1999). Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). Bot. J. Lin. Soc. 130, 81-96.

Larrick, J.W., Thomas, D.W. (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 411-418.

Lee, H., Habas, R., Abate-Shen, C. (2004). Msx1 Cooperates with Histone H1b for Inhibition of Transcription and Myogenesis Science 304, 1675-1678.

Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W. (2004). Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. Cell. 117, 69-81.

Lennox, R.W., Cohen, L.H. (1983). The histone H1 complements of dividing and nondividing cells of the mouse. J. Biol. Chem. 258, 262-268.

Lennox, R.W., Cohen, L.H. (1984). The alterations in H1 histone complement during mouse spermatogenesis and their significance for H1 subtype function. *Dev. Biol.* 103, 80–84.

Lessard, P.A., Kulaveerasingam, H., York, G.M., Strong, A., Sinskey, A.J. (2002). Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *Metab. Eng.* 4, 67-79.

Li, G., Bishop, K.J. and Hall, T.C. (2001). *De novo* activation of the β -phaseolin promoter by phosphatase or protein synthesis inhibitors. *J. Biol. Chem.* 276, 2062-2068.

Li, J. and Chory, J. (1998). Preparation of DNA from *Arabidopsis*. In: J. Martinez-Zapater, J. Salinas (Herausgeber), *Methods in Molecular Biology*, 82, *Arabidopsis* Protocols, 245-258, Humana Press Inc., Totowa, New York.

Lin, Q., Sirotkin, A., Skoultchi, A.I. (2000). Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol* 20, 2122.

Lin, Q., Inselman, A., Han, X., Xu, H., Zhang, W., Handel, M.A., Skoultchi, A.I. (2004). Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 23525-35.

Logemann, E., Parniske, M., Hahlbrock, K. (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5905-5909.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Matzke, A.J., Matzke, M.A.. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 142-148.

McElroy, D., Blowers, A.D., Jenes, B., Wu, R. (1991). Construction of expression vectors based on the rice actin1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* 231, 150-160.

McElroy, D., Brettell, R.I.S. (1994). Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends Biotechnol.* 12, 62–68.

Mes, J.J., van Doorn, A.A., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B.J.C., Haring, M.A. (2000). Expression of the *Fusarium* resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. *Plant J.* 23, 183-194.

Misteli, T.; Gunjan, A.; Hock, R.; Bustin, M.; Brown, D.T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408, 877-881.

Murai, N., Sutton, D.W., Murray, M.G., Slightom, J.L., Merlo, D.J., Reichert, N.A., Sengupta-Gopalan, C., Stock, C.A., Barker, R.F., Kemp, J.D., and Hall, T.C. (1983). Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222, 476-482.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

Mylona, P., Moerman, M., Yang, W.C., Gloudemans, T., Van de Kerckhove, J., van Kammen, A., Bisseling, T., Franssen, H.J. (1994). The root epidermis-specific pea gene RH2 is homologous to a pathogenesis-related gene. *Plant Mol. Biol.* 26, 39-50.

Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R. G., Manners, J. M. (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67, 325-328.

Napoli, C.A., Lemieux, C., and Jorgensen, R.A. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.

Ner, S.S., Blank, T., Luz Pérez-Parallé, M., Grigliatti, T. A., Becker, P.B., Travers, A.A (2003). HMG-D and Histone H1 Interplay during Chromatin Assembly and Early Embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 276, 37569-37576.

Newell, C.A. (2000). Plant transformation technology: Developments and applications. *Mol. Biotechnol.* 16, 53-65.

Okumoto, S., Schmidt, R., Tegeder, M., Fischer, W.N., Rentsch, Frommer, W.D., Koch, W. (2002). High Affinity Amino Acid Transporters Specifically Expressed in Xylem Parenchyma and Developing Seeds of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 45338-45346.

Olszewski, N. E., Martin, F. B., and Ausubel, F. M. (1988). Specialized binary vector for plant transformation: expression of the *Arabidopsis thaliana* AHAS gene in *Nicotiana tabacum*. *Nucleic Acids Res.* 16, 10765-10782.

Ow, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., Wet, J. R., de Helsinki, D., Rhowell, S.H. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cell and transgenic plant. *Science* 234, 856–859.

Padidam, M. (2003). Chemically regulated gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 169-177.

Parseghian, M.H., Hamkalo, B.A. (2001). A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics. *Biochem. Cell Biol.* 79, 289-304.

Pedersen, A.G., Baldi, P., Chauvin, Y. and Brunak, S. (1999). The biology of eukaryotic promoter prediction -a review. *Comput. Chem.* 15, 191-207.

Potenza, C., Aleman, L., Sengupta-Gopalan, C. (2004). Invited Review: Targeting Transgene Expression In Research, Agricultural, And Environmental Applications: Promoters Used In Plant Transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* 40, 1-22.

Pruss, D., Hayes, J.J., Wolffe, A.P. (1995). Nucleosomal anatomy-where are the histones? *Bioessays* 17, 161–170.

Prymakowska-Bosak, M., Przewloka, M.R., Iwkiewicz, J., Egierszдорff, S., Kuras, M., Chaubet, N., Gigot, C., Spiker, S., Jerzmanowski, A. (1996). Histone H1 overexpressed to high level in tobacco affects certain developmental programs but has a limited effect on basal cellular functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10250–10255.

Prymakowska-Bosak, M., Przewloka, M.R., Slusarczyk, J., Kuras, M., Lichota, J., Kilianczyk, B., Jerzmanowski, A. (1999). Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. *The Plant Cell* 11, 2317–2329.

Przewloka, M.R., Wierzbicki, A.T., Slusarczyk, J., Kuras, M., Grasser, K.D., Stemmer, C., Jerzmanowski, A. (2002). The 'drought-inducible' histone H1s of tobacco play no role in male sterility linked to alterations in H1 variants. *Planta* 215, 371–379.

Rabini, S., Franke, K., Saftig, P., Bode, C., Doenecke, D., and Drabent, B. (2000). Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Exp. Cell Res.* 255, 114-124.

Ramakrishnan, V., Finch, J.T., Graziano, V., Lee, P.L., and Sweet, R.M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362, 219–223.

Ramon, A., Muro-Pastor, M., Scazzocchio, C., Gonzalez, R. (2000). Deletion of the unique gene encoding a typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 35, 223–233.

Rausch, T., Greiner, S. (2004) Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta* 1696 (2), 253-61.

Reintanz, B. (1997). Funktionelle Charakterisierung der Kaliumkanal α -Untereinheit AtKC1 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. University of Cologne, Cologne.

Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J. (2002). Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.* 130, 904-17.

Roberts, W., Selitrennikoff, C.P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1771-1778.

Roy, M., Jain, R.K., Rohila, J. S. and Wu, R. (2000). Production of agronomically superior transgenic rice plants using *Agrobacterium*-transformation methods: present status and future perspectives. *Curr. Sci.* 79, 954-960.

Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, pp 365-386.

Rushton, P.J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, E.I. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14, 749-762.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Schulze, E., Bohle, H. (1976). Geschichte der Zuckerrübenwirtschaft in Europa von der Antike bis zur Neuzeit. In: *Zuckerrübenproduktion*. Paul Parey, Berlin, Hamburg.

Scippa, G.S., Griffiths, A., Chiatante, D., Bray, E.A. (2000). The H1 histone variant of tomato, H1-S, is targeted to the nucleus and accumulates in chromatin in response to water-deficit stress. *Planta* 211, 173–181.

Scippa, G.S., Di Michele, M., Onelli, E., Patrignani, G., Chiatante, D., Bray, E.A. (2004). The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. *J. Exp. Bot.* 394, 99-109.

Sen, G., Wehrman, T.S., Meyers, J.W. and Blau, H.M. (2004). Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat. Genetics* 36, 183-189.

Sevenier, R., Hall, R.D., van der Meer, I.M., Hakkert, H.J.C, van Tunen, A.J., and Koops. A.J. (1998). High level fructan accumulation in transgenic sugar beet. *Nat. Biotechnol.* 16, 843-846.

Sharp, P.A. (2001). RNA Interference. *Genes Dev.* 15, 485-490.

Shen, X., Yu, L., Weir, J. W., Gorovsky, M. A. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*. *Cell* 82, 47-56.

Sirotkin, A. M., Edelmann, W., Cheng, G., Klein-Szanto, A., Kucherlapati, R., Skoultchi, A.I. (1995). Mice develop normally without the H10 linker histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6434-6438.

Song, P., Heinen, J.L., Burns, T.H., and Allen, R.D. (2000). Expression of two tissue-specific promoters in transgenic cotton plants. *J. Cot. Sci.* 4, 217-223.

Strahl, B.D., Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Strasburger, E.(1998). *Lehrbuch der Botanik*. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart.

Stuiver, M.H., Custers, J.H.H.V. (2001). Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411, 865-868.

Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., Kilby, N.J. (2004). Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol.Biol.* 54, 157-174.

Tanaka, M., Hennebold, J.D., Macfarlane, J. and Adashi, E.Y. (2001). A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 128, 655-664.

Terzaghi, W.B., Cashmore, A.R. (1997). Plant cell transfection by electroporation. In: *Methods in Molecular Biology*, 62: Recombinant Gene Expression Protocols. (R. Tuan, Herausgeber) Humana Press, Totowa, New York.

Tjamos, E.C, Beckman C.H. (1989). *Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control*. Cell Biology Springer-Verlag, Berlin.

Tuschl, T., Borkhardt, A. (2002) Small Interfering RNAs: A Revolutionary Tool for the Analysis of Gene Function and Gene Therapy. *Mol. Interv.* 2, 158-167.

Tyagi, A.K (2001). Plant genes and their expression. *Curr. Sci.* 80; 161-169.

Vainstein, A., Fisher, M., and Ziv, M. (1993). Application of reporter genes to carnation transformation. *Hort. Science* 28, 1122–1224.

van den Ende, E., van Laere, A. (1996). Variation in the in vitro generated fructan pattern from sucrose as a function of the purified chicory root 1-SST and 1-FFT concentrations. *J. Exp. Bot.* 47, 1797-1803.

van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., and Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291–299.

Varsha-Wesley, S., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27, 581-590.

Vermaak, D., Steinbach, O.C., Dimitrov, S., Rupp, R.A.W., Wolffe, A.P. (1998). The globular domain of histone H1 is sufficient to direct specific gene repression in early *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* 8, 533–536.

Vigers, A.J., Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 315-323.

Wang, Z.-F., Sirotkin, A.M., Buchold, G.M., Skoultchi, A.I., and Marzluff, W.F. (1997). The mouse histone H1 genes: Gene organization and differential regulation. *J. Mol. Biol.* 271, 124-138.

Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T.J. (2001). Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* 411, 834–842.

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T. K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, Y. and Lassar, A. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251, 761-766.

Wei, T., O'Connell, M.A. (1996). Structure and characterization of a putative drought-induced H1 histone gene. *Plant Mol. Biol.* 30, 255–68.

Whitfield, W.G. , Fellows, G., Turner, B.M. (1986). Characterization of monoclonal antibodies to histone 2B. Localization of epitopes and analysis of binding to chromatin. *Eur. J. Biochem.* 157, 513-521.

Workman, J., Kingston, R. (1998): Alteration of nucleosome Structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545-579.

Ye, G.N., Daniell, H., and Sanford, J.C. (1990). Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 15, 809-819.

Zimmermann, P., Zardi, G., Lehmann, M., Zeder, C., Amrhein, N., Frossard, E., Bucher, M. (2003). Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts. *Plant Biotechnol. J.* 1, 353-360.

Zlatanova, J., Doenecke, D. (1994). Histone H1 zero: a major player in cell differentiation? *FASEB J.* 8, 1260-1268.

7. Anhang

7.1 Quantitative Luciferase-Werte von Promotor-Luciferase-Konstrukten in transgenen Zuckerrüben

Relative Luciferase-Aktivität des Promotor-LUC-Konstruktes für BvTlp1 in transgenen Zuckerrüben (Kap. 3.1.1.1)

Linie	Blatt 3 Monate	Fehler des MW	Blatt 6 Monate	Fehler des MW	Wurzel 3 Monate	Fehler des MW	Wurzel 6 Monate	Fehler des MW
Linie 1	529	134	200	82	187	4	135	9
Linie 2	396	33	69	5	17.472	5.381	8467	3604
Linie 3	97	4	62	5	1.338	866	181	19
Linie 5	163	47	330	196	74.992	9.958	77160	16860
Linie 6	249	53	67	3	48.255	12.484	16856	11251
Linie 8	224	40	67	8	22.445	5.683	14693	2320
Linie 9	64	5	56	4	41.687	18.266	4429	577
Linie 12	696	341	128	33	61.482	33.590	10845	1364
Linie 13	1.353	519	649	438	27.806	9.574	41484	14163
Linie 15	8.299	5.874	203	51	107.928	35.489	223032	50614
Linie 16	192	69	64	3	83.180	22.356	30143	7912
Linie 17	6.251	1.892	623	333	149.941	29.065	37938	12858
Wildtyp	54	1	61	2	113	10	103	14

Relative Luciferase-Aktivität des Promotor-LUC-Konstruktes für BvHis1-r in transgenen Zuckerrüben (Kap. 3.1.1.2)

Linie	Blatt 3 Monate	Fehler des MW	Blatt 6 Monate	Fehler des MW	Wurzel 3 Monate	Fehler des MW	Wurzel 6 Monate	Fehler des MW
Linie 1	1.962	1.051	1.964	449	30.227	12.941	2.497	327
Linie 5	947	463	451	151	63.235	13.650	39.304	4.305
Linie 8	118	29	190	44	1.225	324	841	113
Linie 10	10.649	648	16.782	8.304	64.468	6.101	72.105	8.532
Wildtyp	51	2	67	4	109	3	128	14

Relative Luciferase-Aktivität des Promotor-LUC-Konstruktes für BvMII in transgenen Zuckerrüben (Kap. 3.1.1.3). MW: Mittelwert

Linie	Blatt, 3 Monate	Fehler des MW	Blatt, 6 Monate	Fehler des MW	Wurzel, 3 Monate	Fehler des MW	Wurzel, 6 Monate	Fehler des MW
Linie 2	133	14	90	52	336.357	194.917	21465	7605
Linie 3	109	3	76	8	366	124	500	160
Linie 5	264	48	326	79	20.171	6.340	7103	2443
Linie 8	94	6	54	8	28.493	7.229	6564	2356
Linie 9	363	71	68	22	814.546	111.245	299795	50424
Linie 10	278	53	176	72	527.197	87.303	188365	25139
Linie 12	96	8	76	13	50.316	9.029	24934	4297
Wildtyp	97	5	61	2	176	4	106	13

Relative Luciferase-Aktivität des Promotor-LUC-Konstruktes für BvSmp in transgenen Zuckerrüben (Kap. 3.1.1.4). MW: Mittelwert

Linie	Blatt, 3 Monate	Fehler des MW	Blatt, 7 Monate	Fehler des MW	Wurzel, 3 Monate	Fehler des MW	Wurzel, 7 Monate	Fehler des MW
Linie 7	20.342	2202	4.689	2.038	208	17	78	4
Linie 8	66.270	9000	1.041	165	150	27	65	9
Linie 9	73.849	13844	6.173	1.022	136	18	44	1
Linie 12	138	12	95	4	3.191	875	805	249
Linie 13	120	37	101	7	46.913	14.913	3.789	771
Linie 15	83	4	90	3	413	57	1.544	457
Linie 17	88	3	108	9	3.432	459	1.103	99
Linie 19	749	75	856	317	247.810	83.038	229.378	67.589
Linie 21	289	60	106	10	7.429	984	2.026	493
Linie 26	906	227	636	196	1.480	317	2.733	255
Wildtyp	81	14	51	8	117	14	55	9

Relative Luciferase-Aktivität des Promotor-LUC-Konstruktes für BvTlp2 in transgenen Zuckerrüben (Kap. 3.1.1.5). MW: Mittelwert

Linie	Blatt, 3 Monate	Fehler des MW	Blatt, 7 Monate	Fehler des MW	Wurzel, 3 Monate	Fehler des MW	Wurzel, 7 Monate	Fehler des MW
Linie 1	141	36	256	74	1.194	215	230	68
Linie 4	1.116	263	1.843	392	5.889	2.205	7.196	1.354
Linie 6	25.929	9.746	23.842	18.150	1.376	226	327	40
Linie 7	114.369	43.370	15.273	8.662	107.307	63.280	44.919	14.373
Linie 10	8.401	5.083	3.428	2.051	5.591	1.846	687	145
Linie 11	1.022	236	206	47	23.657	10.209	5.193	688
Linie 12	1.080	574	1.666	712	23.744	13.673	4.003	545
Linie 13	533.238	134.729	54.806	17.672	43.224	10.245	25.786	8.583
Linie 14	4.811	3.852	2.803	750	249	11	181	7
Wildtyp	97	5	67	14	159	3	128	14

7.2 Quantitative GUS-Werte von Promotor-GUS-Konstrukten von fünf Zuckerrübenpromotoren in Tabak

GUS-Aktivität des Promotor-GUS-Reportergenkonstruktes für BvSmp in Tabak (Kap. 3.1.2.1). MW: Mittelwert; nd: nicht bestimmt. Einheit: pmol 4-MU/(min x mg)

GUS-Aktivität in pmol MU x min ⁻¹ x µg ⁻¹ gesamte lösliche Proteine			
Linie	Wurzel	Blatt	Hypocotyl
36G2	803	31	534
36G4	525	11	nd
36G5	1333	40	724
36G6	365	23	nd
36G11	618	6	nd
36G12	873	26	nd
Mittelwert	830,4	22,8	629
Fehler des MW	138	5	95

GUS-Aktivität des Promotor-GUS-Reportergenkonstruktes für BvMII in Tabak (Kap. 3.1.2.2). MW: Mittelwert; nd: nicht bestimmt.

GUS-Aktivität in pmol MU x min ⁻¹ x µg ⁻¹ gesamte lösliche Proteine			
Linie	Wurzel	Blatt	Hypocotyl
48G4	1979	88	842
48G9	5428	19	nd
48G10	778	10	200
48G11	4966	240	nd
48G13	9375	198	3758
48G16	8681	13,2	2952
48G23	417	13	nd
48G25	7331	383	2952
Mittelwert	4869	121	2141
Fehler des MW	1240	49	685

GUS-Aktivität des Promotor-GUS-Reportergenkonstruktes für BvTlp1 in Tabak (Kap. 3.1.2.3). MW: Mittelwert; nd: nicht bestimmt.

GUS-Aktivität in pmol MU x min ⁻¹ x µg ⁻¹ gesamte lösliche Proteine			
Linie	Wurzel	Blatt	Hypocotyl
88G2	101	2	nd
88G3	47	4	48
88G6	441	6	74
88G12	156	8	33
Mittelwert	186	5	52
Fehler des MW	88	1	12

GUS-Aktivität des Promotor-GUS-Reportergenkonstruktes für BvTlp2 in Tabak (Kap. 3.1.2.4). MW: Mittelwert; nd: nicht bestimmt.

GUS-Aktivität in pmol MU x min ⁻¹ x µg ⁻¹ gesamte lösliche Proteine			
Linie	Wurzel	Blatt	Hypocotyl
LWF05-1	20618	80	428
LWF05-2	20845	94	200
LWF05-3	5615	23	Nd
LWF05-4	934	5	37
LWF05-5	2156	37	48
LWF05-7	1095	9	nd
Mittelwert	8544	41	178
Fehler des MW	3915	15	91

GUS-Aktivität des Promotor-GUS-Reportergenkonstruktes für BvHis1-r in Tabak (Kap. 3.1.2.5). MW: Mittelwert; nd: nicht bestimmt.

GUS-Aktivität in pmol MU x min ⁻¹ x µg ⁻¹ gesamte lösliche Proteine			
Linie	Wurzel	Blatt	Hypocotyl
47G2	3642	3648	4200
47G3	3411	3371	2716
47G5	8146	8331	6270
47G9	17473	27679	15635
47G12	8923	7986	8762
Mittelwert	8319	10203	7516,6
Fehler des MW	2551	4492	2270

7.3 Quantitative GUS-Werte von Promotor-GUS-Konstrukten der Promotoren der drei Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana*.

GUS-Aktivität der Promotor-GUS-Reportergenkonstrukte für die Promotoren von His1-1, His1-2, His1-3 aus *Arabidopsis thaliana* sowie eines CaMV 35S GUS-Konstruktes (Kap. 3.2). Einheit: pmol 4-MU/(min x mg), Fehler MW: mittlerer Fehler des Mittelwerts.

Linie	Blatt	Fehler MW	Wurzel	Fehler MW	Schote	Fehler MW	Sprossachse	Fehler MW	Blüte	Fehler MW
P1-1	15134	2266	9287	2107	7672	745	11288	167	23262	3427
P1-10	15372	1555	12226	1504	15473	4889	21560	2043	35064	7696
P1-12	20991	2001	9803	234	25168	5006	22977	5106	33263	5147
P2-2	7526	1518	1983	189	9025	1865	2517	885	5634	1275
P2-4	14249	1956	3480	766	11655	1647	5693	1665	10785	1959
P2-5	2261	243	466	76	2829	281	946	243	2529	353
P3-1	14745	2235	3123	190	3003	136	484	97	2267	343
P3-2	5162	409	290	28	784	123	190	11	752	249
P3-3	2330	187	539	80	299	61	178	77	227	79
CaMV 35S	12067	942	71330	12219	8255	900	7320	412	23911	7936

7.4 Katalogisierte Oligonukleotide

Bezeichnung	Nummer	In Tabelle oder Kapitel
2-1-36-P1	4019	Tab. 1
2-1-36-P2	4020	Tab. 1
2-1-47-P1	4021	Tab. 1
2-1-47-P2	4022	Tab. 1
2-1-48-P1	4023	Tab. 1
2-1-48-P2	4024	Tab. 1
2-1-88-P3	4025	Tab. 1
2-1-88-P1	4026	Tab. 1
His1-R	4027	Tab. 2
His1-L	4028	Tab. 2
His2-R	4029	Tab. 2
His2-L	4030	Tab. 2
His3-R	4031	Tab. 2
His3-L	4032	Tab. 2
Intron-L	4033	Tab. 2
Intron-R	4034	Tab. 2
LH1-Prom-Right	4035	Tab. 3
LH1-Prom-Left	4036	Tab. 3
LH2-Prom-Right	4037	Tab. 3
LH2-Prom-Left-	4038	Tab. 3
LH3-Prom-Right	4039	Tab. 3
LH3-prom-Left-K	4040	Tab. 3
cDNA-His1-1-Rechts	4041	Tab. 4
cDNA-His1-1-Links	4042	Tab. 4
cDNA-His1-2-Rechts	4043	Tab. 4
cDNA-His1-2-Links	4044	Tab. 4
cDNA-His1-3-Rechts	4045	Tab. 4
cDNA-His1-3-Links	4046	Tab. 4
Kontrolle_A_Right	4047	Tab. 5
Kontrolle_A_Left	4048	Tab. 5
Kontrolle_B_Right	4049	Tab. 5
Kontrolle_B_Left	4050	Tab. 5
Kontrolle_C_Right	4051	Tab. 5

Bezeichnung	Nummer	In Tabelle oder Kapitel
Kontrolle_C_Left	4052	Tab. 5
GapC-L	3532	Tab. 5
GapC-R	3533	Tab. 5
SALK_128430-1A-L	4053	Tab. 6
SALK_128430-1A-R	4054	Tab. 6
SALK_025209-3-L	4055	Tab. 6
SALK_025209-3-L	4056	Tab. 6
T-DNA-pROK2-LB-P	4057	Tab. 6
His1-1smallRNA-S	4058	Kap. 2.6

7.5 Katalogisierte DNA-Konstrukte

Bezeichnung	DNA-Nummer	Glycerinkultur (<i>A. tumefaciens</i>)	Tabelle
36G-pGUS3	4059		Tab. 7
47G-pGUS3	4060		Tab. 7
48G-pGUS3	4061		Tab. 7
88G-pGUS3	4062		Tab. 7
LWFG-pGUS3	4063		Tab. 7
36-GUS-pOCA28	4079		Tab. 7
47-GUS-pOCA28	4080		Tab. 7
48-GUS-pOCA28	4081		Tab. 7
88-GUS-pOCA28	4082		Tab. 7
LWF05-GUS-pOCA28	4083		Tab. 7
36-LUC-pGPTV-Bar	4064		Tab. 8
47-LUC-pGPTV-Bar	4065		Tab. 8
48-LUC-pGPTV-Bar	4066		Tab. 8
88-LUC-pGPTV-Bar	4067		Tab. 8
LWF05-LUC-pGPTV-Bar	4068		Tab. 8
His1-1-ihp	4069	2561	Tab. 9
His1-2-ihp	4070	2562	Tab. 9
His1-3-ihp	4071	2563	Tab. 9
His1-1pQE30	4073		Tab. 11
His1-2pQE30	4074		Tab. 11
His1-3pQE30	4075		Tab. 11
His1-1Prom-pVK-GUS3		2557	Tab. 10
His1-2Prom-pVK-GUS3		2558	Tab. 10

His1-3Prom-pVK-GUS3		2559	Tab. 10
pART27		2568	Kap. 2.3
pGPTV-Bar		2569	Kap. 2.3
JE3-pBT-35S-LUC-m3	4078		Kap.2.3

7.6 Katalogisierte Samen

7.6.1 Transgene Tabaklinien

Pflanzen mit Promotor-GUS-Konstrukten von 2-1-36 (BvSmp), resistent gegen Kanamycin,
Kap. 3.1.2.1

Nummer	Linie
3941	36-2
3942	36-3
3943	36-4
3944	36-5
3945	36-6
3946	36-9
3948	36-18
3949	36-7
3950	36-10

Pflanzen mit Promotor-GUS-Konstrukten von 2-1-48 (BvMII), resistent gegen Kanamycin,
Kap. 3.1.2.2

Nummer	Linie
3951	48-4
3952	48-8
3953	48-9
3954	48-13
3955	48-15
3956	48-16
3957	48-20
3958	48-23
3959	48-17
3960	48-11
3961	48-25

Pflanzen mit Promotor-GUS-Konstrukten von 2-1-47 (BvHis1-r), resistent gegen Kanamycin,
Kap. 3.1.2.5

Nummer	Linie
3962	47-1
3963	47-2

3964	47-3
3965	47-4
3966	47-5
3967	47-9
3968	47-12

Pflanzen mit Promotor-GUS-Konstrukten von 2-1-88 (BvTlp1), resistent gegen Kanamycin,
Kap. 3.1.2.5

Nummer	Linie
3969	88-2
3970	88-3
3971	88-5
3972	88-6
3973	88-7
3974	88-12

Pflanzen mit Promotor-GUS-Konstrukten von LWF05 (BvTlp2), resistent gegen Kanamycin,
Kap. 3.1.2.4

Nummer	Linie
3975	LWF1
3976	LWF2
3977	LWF3
3978	LWF4
3979	LWF5
3980	LWF7

7.6.2 Arabidopsis-Samen

Salk-T-DNA-Insertionslinie für His1-1, SALK_128430, Kap. 2.12.1.3

Nummer	Linie, Bezeichnung
3905	Salk-His1-1-Knock-out

His1-1 Single-Knock-down Linien, Kanamycin-resistent, Kapitel 3.3

Nummer	Linie
3898	A9
3899	A10
3900	A12
3901	A14
3902	A16
3903	A18
3904	A15

His1-2-Single-Knock-down Linien, Phosphinothricin-resistent, Kapitel 3.3

Nummer	Linie
3906	B1
3907	B5
3908	B7
3909	B14
3910	B6
3911	B8

His1-3 Single-Knock-down Linien, Hygromycin-resistent, Kapitel 3.3

Nummer	Linie
3912	C2
3913	C3
3914	C5
3915	C6
3916	C7
3917	C11
3918	C27

His1-Triple-Knock-down-Linien und His1-1/His1-2-Double-Knock-down-Linien, Kap. 3.3.3.2

Bezeichnung	Linie
TKD #1	3937
His1-1/1-2-DKD #1	3937a
TKD #2	3938
His1-1/1-2-DKD #2	3938a
TKD #3	3939
His1-1/1-2-DKD #3	3939a

In Kap 3.3.3.2 ist angegeben, welche Single-Knock-down Linien für die Herstellung der Triple-Knock-downs eingesetzt worden sind. Die Double-Knock-down Linien, die für die Kreuzungen eingesetzt worden sind, haben jeweils die gleiche Nummer wie die hergestellten Triple-Knock-downs (#1, #2 oder #3).

His1-1 Promotor-GUS-Pflanzen, resistent gegen Methothrexat, Kapitel 3.2

Nummer	Linie
3919	1-1
3920	1-2
3921	1-5
3922	1-10
3923	1-11
3924	1-12

His1-2 Promotor-GUS-Pflanzen, resistent gegen Methothrexat, Kapitel 3.2

Nummer	Linie
3925	2-2
3926	2-5
3927	2-8
3928	2-4
3929	2-7
3930	2-10
3931	2-9

His1-3 Promotor-GUS-Pflanzen, resistent gegen Methothrexat, Kapitel 3.2

Nummer	Linie
3932	3-1
3933	3-2

3934	3-3
3935	3-4
3936	3-5

CaMV 35S Promotor-GUS-Linie, resistent gegen Kanamycin:

Nummer

3976

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir bei der Erstellung meiner Doktorarbeit zur Seite gestanden haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Hehl dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten. Weiterhin bedanke ich mich bei ihm für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation sowie dafür, dass er mir die Teilnahme an einem internationalen Kongress ermöglicht hat.

Bei Herrn Prof. Ralf-Rainer Mendel bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Koreferat zu übernehmen.

Ich bedanke mich bei Dr. Dietmar Stahl von der Planta GmbH in Einbeck und seiner Arbeitsgruppe für die Herstellung der transgenen Zuckerrüben und für die Unterstützung bei der Durchführung der Luciferase-Assays.

Großer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Hehl sowie allen anderen Kollegen am Institut für Genetik für die sehr gute Zusammenarbeit und das hervorragende Arbeitsklima. Es wird sicherlich nicht leicht werden, jemals wieder so nette Kollegen zu finden.

Bei René Pietsch bedanke ich mich für die Herstellung der Promotor-Reporter-genkonstrukte für die Promotoren der Linker-Histon-Varianten aus *Arabidopsis thaliana*.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern sowie Torsten und Daniel für die große Unterstützung während der Arbeit.

Lebenslauf

Name: Heiko Oltmanns
Geburtsdatum: 29.04.1974
Geburtsort: Leer (Ostfriesland)
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980 -1984 Grundschole Neukamperfehn
1984 -1986 Orientierungsstufe Westergaste, Brinkum
1986 -1993 Teletta-Groß-Gymnasium, Leer (Ostfriesland), Abschluss: Abitur

Wehrdienst

07/93 – 06/94 Wehrdienst, Luftlandebrigade 31, Oldenburg

Studium

10/94 – 11/00 Diplomstudiengang Biotechnologie an der TU Braunschweig
09/1996 Vordiplom
11/99 – 05/00 Diplomarbeit am Institut für Genetik, TU Braunschweig,
Thema: Identifizierung und Isolierung der Promotorregion zweier
wurzel-spezifischer Gene der Zuckerrübe
11/2000: Studienabschluss

ab Januar 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik an der TU
Braunschweig, Arbeitsgruppe Professor R. Hehl

Allgemeine Veröffentlichungen

Kloos, D. U., Oltmanns, H., Dock, C., Stahl, D., Hehl, R. (2002). Isolation and molecular analysis of six taproot expressed genes from sugar beet. Journal of Experimental Botany 53, 1533-1534.